

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Klemen ZUPANČIČ

**VPLIV GOJENJA V TRIDIMENZIONALNEM OKOLJU  
NA RAST IN DIFERENCIACIJO HUMANIH MATIČNIH  
CELIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Klemen ZUPANČIČ

**VPLIV GOJENJA V TRIDIMENZIONALNEM OKOLJU NA RAST  
IN DIFERENCIACIJO HUMANIH MATIČNIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF CULTURE IN THREE DIMENSIONAL  
ENVIRONMENT ON GROWTH AND DIFFERENTIATION OF  
HUMAN STEM CELLS**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2009

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

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 19.5.2009 za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Miomirja Kneževića, za somentorico dr. Darjo Marolt in za recenzenta prof. dr. Petra Dovča.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Član prof. dr. Peter DOVČ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 29.6.2009

Naloga je 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.

Klemen ZUPANČIČ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.9:611.018:57.086.83 (043.2)
KG	matične celice/tkvne kulture/hidrogeli/embrioidna telesca
AV	ZUPANČIČ, Klemen
SA	KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/MAROLT, Darja (somentor)
KZ	SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	VPLIV GOJENJA V TRIDIMENZIONALNEM OKOLJU NA RAST IN DIFERENCIACIJO HUMANIH MATIČNIH CELIC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 57 str., 8 pregl., 26 sl., 73 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Glavni problem matičnih celic, ki jih želimo manipulirati v laboratoriju, je težko nadzorovana diferenciacija v želeno smer. Čedalje več raziskav upošteva, da je pomemben dejavnik pri diferenciaciji matičnih celic tudi njihovo tridimenzionalno (3D) okolje, ki je različno in specifično za vsako tkivo. Kot 3D okolje lahko uporabljamо celične nosilce, med katerimi so pomembni hidrogeli (kolagen, hialuronska kislina, alginat). V raziskovalnem delu te diplomske naloge smo žeeli preveriti, kako takšno 3D okolje vpliva na rast in diferenciacijo človeških matičnih celic v primerjavi s klasičnimi oblikami 3D okolja (celični peleti in embrioidna telesca). Poskuse smo izvajali na človeških embrionalnih matičnih celicah (hESC) ter na matičnih celicah iz maščevja (hASC). Živost celic smo ocenili s testom Live/Dead, metabolno aktivnost smo ocenili s testom XTT, število celic z merjenjem količine DNA, za smer diferenciacije pa smo celicam izmerili izražanje genov s PCR v realnem času. Izkazalo se je, da so hASC v kolagenskem gelu rastle bolje kot v hialuronski kislini, izražanje genov v kolagenu pa je bilo podobno kontrolnim skupinam. Pri gojenju hESC smo opazili, da so bile celice, gojene v hialuronski kislini, bistveno bolj nediferencirane, gojenje v kolagenskem gelu pa spodbuja podobno diferenciacijo, kot jo kažejo celice v embrioidnih telescih. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da lahko različno celično okolje bistveno vpliva na celično diferenciacijo. V kombinaciji z rastnimi faktorji, hidrogeli ponujajo različne možnosti za gojenje matičnih celic.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 602.9:611.018:57.086.83 (043.2)  
CX stem cells/tissue cultures/hydrogels/embrioid bodies  
AU ZUPANČIČ, Klemen  
AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/MAROLT, Darja (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in  
Biotechnology  
PY 2009  
TI THE EFFECT OF CULTURE IN THREE DIMENSIONAL ENVIRONMENT ON  
GROWTH AND DIFFERENTIATION OF HUMAN STEM CELLS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XII, 57 p., 8 tab., 26 fig., 73 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The main obstacle, when manipulating stem cells in the laboratory is that the path  
of their differentiation is difficult to control. More and more studies are  
investigating the effects of three-dimensional (3D) environment on differentiation  
of stem cells, which is different and unique for every tissue type. Cell scaffolds can  
be used as 3D environment, among which hydrogels are notable (collagen,  
hyaluronic acid, alginate). In experiments for this thesis we investigated the effects  
of 3D environment on growth and differentiation of human stem cells in  
comparison to classic forms of 3D environment (pellets of cells and embryoid  
bodies). Our experiments were done on human embryonic stem cells (hESC) and  
adipose stem cells (hASC). We estimated viability of cells using Live/Dead assay,  
metabolic activity using XTT assay, number of cells by measuring quantity of  
DNA, and for determining gene expression and thus differentiation path real-time  
PCR was used. hASC grew better in collagen gel than in hyaluronic acid, gene  
expression of cells in collagen was similar to control groups. When cultures of  
hESC were observed, the cells, grown in hyaluronic acid were significantly more  
undifferentiated compared to the cells, grown in collagen, that showed similar  
differentiation pathway to the cells in embryoid bodies. Based on our results we  
can conclude, that different cell environments can significantly affect cell  
differentiation. In combination with growth factors, hydrogels offer different  
possibilities for culture of stem cells.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>Ključna dokumentacijska informacija (KDI)</b>	III
<b>Key word documentation (KWD)</b>	IV
<b>Kazalo vsebine</b>	V
<b>Kazalo preglednic</b>	VII
<b>Kazalo slik</b>	VII
<b>Okrajšave in simboli</b>	VIII
<b>Slovarček</b>	IX
	XI
 <b>1 UVOD</b>	 1
1.1 HIPOTEZA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	3
2.1 RAZLIČNI TIPI MATIČNIH CELIC	3
<b>2.1.1 Človeške embrionalne matične celice</b>	4
2.1.1.1 Fenotip in morfologija	5
2.1.1.2 Hranilna plast	6
<b>2.1.2 Matične celice iz maščevja</b>	6
2.1.2.1 Fenotip in morfologija	7
<b>2.2 OBIČAJNI PRISTOPI K DIFERENCIACIJI MATIČNIH CELIC</b>	8
<b>2.2.1 Diferenciacija ESC</b>	8
<b>2.2.2 Diferenciacija ASC</b>	9
<b>2.2.3 Genetski profil celičnih tipov</b>	10
<b>2.3 DIFERENCIACIJA MATIČNIH CELIC V 3D OKOLJU</b>	11
<b>2.3.1 Celični skupki</b>	11
<b>2.3.2 Nosilci</b>	12
2.3.2.1 Ohranjanje hESC v nediferenciranem stanju v hidrogelu	13
2.3.2.2 Diferenciacija matičnih celic na 3D nosilcih	13
2.3.2.3 Diferenciacija matičnih celic z enkapsulacijo regulatornih faktorjev	14
2.3.2.4 Gojenje in diferenciacija hESC v kolagenu	14
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	15
<b>3.1 MATERIALI IN APARATURE</b>	15
<b>3.1.1 Kemikalije in plastični pripomočki</b>	15
<b>3.1.2 Aparature</b>	17
<b>3.1.3 Gojišča in pufri</b>	17
<b>3.1.4 Reagenti za PCR v realnem času</b>	18
<b>3.1.5 Celice</b>	18
3.1.5.1 Humane matične celice	18
3.1.5.2 Hranilna plast	18
<b>3.2 METODE GOJENJA CELIC</b>	19
<b>3.2.1 Rast in menjava gojišča</b>	19
<b>3.2.2 Presajevanje hASC</b>	19
<b>3.2.3 Presajevanje hESC</b>	20
<b>3.2.4 Zamrzovanje hASC</b>	20
<b>3.2.5 Odmrzovanje hASC</b>	21

3.3	METODE KARAKTERIZACIJE CELIC	21
<b>3.3.1</b>	<b>Merjenje metabolne aktivnosti s testom XTT</b>	21
3.3.2	Ocena živosti s testom Live/Dead	22
3.3.3	Štetje celic s števno komoro	22
3.3.4	Določanje števila celic z merjenjem DNA	23
3.3.5	Izolacija RNA	24
3.3.6	Merjenje koncentracije RNA	25
3.3.7	Metoda reverzne transkripcije in PCR (RT-PCR)	25
<b>3.3.8</b>	<b>Določanje aktivnosti genov z metodo PCR v realnem času</b>	26
3.4	GOJENJE MATIČNIH CELIC V 3D OKOLJU	27
<b>3.4.1</b>	<b>Celice v mikromasah</b>	27
3.4.2	Celice v peletih	27
3.4.3	Celice v EB	28
3.4.4	Celice v kolagenu	28
<b>3.4.5</b>	<b>Celice v HA</b>	29
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	30
4.1	RAST IN DIFERENCIJACIJA HASC	30
<b>4.1.1</b>	<b>Celice v peletih</b>	30
<b>4.1.2</b>	<b>Celice v kolagenu</b>	31
<b>4.1.3</b>	<b>Celice v HA</b>	32
4.2	RAST IN DIFERENCIJACIJA HESC	34
<b>4.2.1</b>	<b>Celice v peletih</b>	34
<b>4.2.2</b>	<b>Celice v EB</b>	35
<b>4.2.3</b>	<b>Celice v hidrogelih</b>	36
4.2.3.1	Vpliv bFGF na posamezne celice v kolagenu	36
4.2.3.2	Vpliv medceličnih stikov na rast hESC	37
4.2.3.3	Vpliv gojišč na rast in diferenciacijo hESC	41
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	45
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	49
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	51
	<b>ZAHVALA</b>	57

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Tri zarodne plasti ter glavna tkiva in organi, ki se iz njih razvijejo	4
Preglednica 2: Rastni faktorji in vpliv, ki ga imajo na hESC	8
Preglednica 3: Diferenciacijski potencial hASC ter faktorji, ki inducirajo diferenciacijo	10
Preglednica 4: Geni, značilni za določeno zarodno plast in celični tip	10
Preglednica 5: Seznam glavnih kemikalij in plastičnih pripomočkov	15
Preglednica 6: Seznam aparatur, ki smo jih uporabljali za izvedbo poskusov	17
Preglednica 7: Seznam gojišč, ki smo jih uporabljali za gojenje celic in njihova sestava	17
Preglednica 8: Seznam reagentov za merjenje izražanja genov	18

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shematičen prikaz razvojnih poti matičnih celic	9
Slika 2: Različna tkiva, v katera je možno usmeriti diferenciacijo hASC	10
Slika 3: Gojenje hASC v skupkih, ki smo jih centrifugirali z različnimi hitrostmi	30
Slika 4: Izražanje genov glede na GAPD hišni gen	31
Slika 5: Število celic (merjenje DNA) in njihova metabolna aktivnost (reakcija z XTT)	31
Slika 6: Živost celic četrti dan	32
Slika 7: Izražanje genov glede na GAPD hišni gen	32
Slika 8: Metabolna aktivnost celic, gojenih v HA	33
Slika 9: Gojenje hASC v HA po dnevih	33
Slika 10: Celice v peletih po 5 dneh	34
Slika 11: Utrapanje peleta	35
Slika 12: Izražanje genov v hESC peletih po 41 dneh gojenja	35
Slika 13: hESC gojene v EB 7 dni pri različnih povečavah	36
Slika 14: Serija slik testa L/D posameznih celic, gojenih v kolagenu z in brez bFGF	37
Slika 15: Število hESC v posamezni kapljici gela skozi čas	37
Slika 16: Primerjava živosti CS in PC v kolagenskem gelu	38
Slika 17: Število celic skozi čas, določeno na podlagi količine DNA.	39
Slika 18: Primerjava živosti CS in PC v HA	39
Slika 19: Živost skupkov hESC različnih velikosti v kolagenskem gelu	40
Slika 20: Primerjava izražanja genov med CS, PC ter EB	41
Slika 21: Izražanje gena Oct4 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.	42
Slika 22: gena Sox2 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.	42
Slika 23: gena Brachyury v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.	43
Slika 24: gena Foxa2 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.	43
Slika 25: gena Sox17 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.	44
Slika 26: gena Pax6 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.	44

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2D	dvodimenzionalen
3D	tridimenzionalen
BF	svetlo polje; način slikanja pri mikroskopiji (ang. bright field)
bFGF	osnovni rastni faktor fibroblastov (ang. basic fibroblast growth factor)
BMP	protein kostne morfogeneze (ang. bone morphogenic protein)
cDNA	komplementarna DNA (ang. complementary DNA)
CS	celični skupki
DKK1	dickkopf homolog 1
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
EB	embrioidno telesce (ang. embryo body)
FBS	fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serum)
FDA	ameriška Agencija za hrano in zdravila (ang. Food and drug administration)
FL	hranilna plast (ang. feeder layer)
GDF	rastni faktor diferenciacije (ang. growth differentiation factor)
HA	hialuronska kislina (ang. hyaluronic acid)
(h)ASC	(humane oz. človeške) matične celice iz maščevja (ang.: adipose stem cells)
(h)ESC	(humane oz. človeške) embrionalne matične celice (ang.: embryonic stem cells)
IBMX	izobutilmetilksantin
ICM	notranja celična masa pri zarodku na stopnji blastociste (ang.: inner cell mass)
IL	interlevkin
iPSC	inducirane pluripotentne matične celice (ang. induced pluripotent stem cells)
IVF	<i>in vitro</i> oploditev (ang. <i>in vitro</i> fertilisation)
L/D	Live/Dead test
LIF	levkemija inhibitorni dejavnik (ang. leukemia inhibitory factor)
MAPC	multipotentne prednice odraslega (ang. multipotent adult progenitor cells)
mEF	mišji mitotsko inaktivirani fibroblasti (ang. mouse embrionic fibroblast)
mEF-CM	gojišče, predhodno inkubirano na hranilni plasti mEF (ang. mEF conditioned medium)
MM	mikromasa
mRNA	informacijska RNA (ang. messenger RNA)
MSC	mezenhimske matične celice (ang. mesenchymal stem cells)
Oct4	oktamer 4
PC	posamezne celice
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PDGF	rastni faktor iz krvnih ploščic (ang. platelet-derived growth factor)
qPCR	PCR v realnem času, tudi kvantitativna PCR (ang. real-time PCR, quantitative PCR)
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
RT	reverzna transkriptaza

RT-PCR	reverzna transkripcija in PCR (uporaba encima reverzna transkriptaza)
SSEA	ang. stage-specific embryonic antigen
TDGF	rastni faktor iz teratomov (ang. teratocarcinoma-derived growth factor)
TGF- $\beta$	transformirajoči rastni faktor $\beta$ (ang. transforming growth factor $\beta$ )
VEGF	rastni faktor žilnega endotelija (ang. vascular endothelial growth factor)
X-SCID	huda kombinirana imunska pomanjkljivost vezana na X kromosom (ang. X-linked severe combined immunodeficiency)

## SLOVARČEK

<b>Alogen</b>	O alogeni presaditvi govorimo, kadar sta darovalec celic, tkiva oz. organa in prejemnik dve različni osebi.
<b>Avtologno</b>	O avtologni presaditvi govorimo, kadar je darovalec celic, tkiva oz. organa tudi prejemnik. Celice oz. tkivo pa se lahko med tem tudi manipulira <i>in vitro</i> .
<b>Embrioidno telesce</b>	Skupek matičnih celic, ki prosto plava v gojišču. Trenutno je edini <i>in vitro</i> model, ki ponazarja prve korake embriogeneze.
<b>Fenotip</b>	Izgled, morfologija celic, tkiv ali organizmov, ki je posledica vpliva genotipa in okolja.
<b>Genotip</b>	DNA zapis nekega organizma, za katerega pa ni nujno, da se izrazi tudi na fenotipu.
<b>Hišni gen</b>	Gen, ki je vedno enakomerno izražen, ne glede na tkivo in starost organizma ali celic. Uporablja se ga kot primerjalni gen, kadar ocenujemo izražanje drugih genov.
<b>Hranilna plast</b>	Plast mitotsko inaktiviranih celic (običajno mEF), ki služijo kot površina, na katero se pritrjajo ESC. V gojišče tudi izločajo dejavnike, ki ohranjajo matične celice v nediferenciranem stanju.
<b><i>In vitro</i></b>	Lat. "v steklu", uporablja se za postopke, izvedene v laboratoriju
<b><i>In vivo</i></b>	Lat. "v živem", uporablja se za postopke, izvedene v živem bitju
<b>Izvencelični matriks</b>	Snov, ki obdaja celice v tkivu. Njegova sestava in količina variira od tkiva do tkiva. Pogosto ga sestavlja hialuronska kislina in kolagen. Celicam nudi oporo, rastne faktorje in omogoča medcelično komunikacijo.
<b>Mikromasa</b>	Če adherentne celice v gosti suspenziji nanesemo v kapljicah na površino gojilne posode, se bodo celice le na področju kapljice prijele na površino in tvorile gosto mikromaso.
<b>Multipotentnost</b>	Sposobnost celic, da tvorijo več celičnih tipov, lahko tvorijo celotno tkivo ali tkiva. Kot primer takih celic so krvotvorne matične celice.
<b>Notch regulatorna pot</b>	Pomembna regulatorna pot, značilna v matičnih celicah, kjer regulira samoobnavljanje.
<b>Plastičnost</b>	Nedokazano opažanje, da tkivne matične celice lahko razširijo svojo potentnost kot odgovor na fiziološke potrebe ali dražljaje.
<b>Pluripotentnost</b>	Sposobnost celic, da tvorijo vse telesne celice, vključno z germinalnimi celicami in nekaj ali vsa ekstraembrionalna tkiva. Kot primer so embrionalne matične celice.
<b>Predniška celica</b>	Potomska celica matične celice v direktni liniji. Iz multipotentnih tkivno specifičnih matičnih celic se razvijejo predniške celice, ki se delijo in končno diferencirajo v zrele somatske celice organov.
<b>Prenos jedra</b>	Tehnika, pri kateri z majhno pipeto prenesemo jedro iz somatske celice v oplojeno jajče. Pred tem jajčecu odstranimo jedro. Na ta način dobimo zarodek z genomom neke druge somatske celice.
<b>Samoobnavljanje</b>	Celične delitve, ki v vsakem ciklu generirajo vsaj eno hčerinsko celico, ki je popolnoma enaka materinski in ima latentno sposobnost diferenciacije. Ta lastnost definira matične celice.

<b>Somatska celica</b>	Vsaka celica v telesu razen gamet (jajčece in spremiji).
<b>Teratokarcinom</b>	Teratokarcinom je epiteljski malignom, ki je nastal iz prirojene nepravilnosti razvoja kakega organa ali tkiva. Teratomi spadajo med teratokarcinome.
<b>Teratom</b>	Epiteljski malignom, v katerem so celice vseh treh zarodnih plasti. Nastanek teratoma po implantaciji dokazuje nediferenciranost matičnih celic v implantantu.
<b>Totipotentnost</b>	Sposobnost celic, da tvorijo celoten organizem, vključno s trofoblastom. Totipotentna je zigota, pri rastlinah pa meristemske celice. Do sedaj to še ni bilo prikazano pri nobeni matični celici vretenčarjev.
<b>Unipotentnost</b>	Unipotentne celice so sposobne tvoriti le en celični tip.
<b>Wnt regulatorna pot</b>	Pot sodeluje pri nastanku polarnosti v embriogenezi. Bilo pa je zanje pokazano, da v kulti hESC in mišjih ESC aktivacija <i>Wnt</i> signalne poti vodi v razvoj multipotentne prednice odraslega (MAPC) v kulti monosloja. Ta celica se lahko razvije v zarodno plast mezoderma ali endoderma, ne pa ektoderma.
<b>X-SCID miši</b>	Miši z genetsko okvaro imunskega sistema X-SCID. V njih lahko implantiramo človeške celice in tkiva, ker se na njih imunsko ne odzovejo. V tkivnem inženirstvu se uporabljajo kot eden od dokazov, da implantirane celice kažejo pluripotentnost, če te tvorijo v miših teratome.

## 1 UVOD

Pred dobrimi sto leti je Ross Harrison na Johns Hopkins University izvedel svoj znan eksperiment, ki je vključeval gojenje embrionalnega tkiva. Vzel je delce nevralne cevi žabjih zarodkov in iz njih dobil razrast živčnih vlaken *in vitro* (Harrison, 1907). Tako je bila postavljena osnova tkivnega inženirstva. Tkivno inženirstvo se danes osredotoča na izdelovanje funkcionalnih tkiv in organov, namenjenih za implantacijo v bolnike, ki bi jih potrebovali. Pristopi so različni, od izdelave popolnoma sintetičnih tkivnih nadomestkov, do izdelave tkiv iz matičnih celic. Veja tkivnega inženirstva, ki se osredotoča na slednji način, se imenuje regenerativna medicina.

V letih po 1970 so nova odkritja v biotehnologiji omogočila razvoj različnih bioloških zdravil, kot so rekombinantni proteini, molekularna cepiva in protitelesa. V letih po 1980 so se začeli razvijati principi zdravljenja s celičnimi terapijami in tkivnim inženirstvom. Začelo se je z izdelavo kože že leta 1980 (Bell in sod., 1981; Burke in sod., 1981), sledila pa so tkiva kot so hrustanec (Vacanti in sod., 1991), srčne zaklopke (Shinoka in sod., 1996), celice jeter (Lavon in sod., 2004), celice otočkov trebušne slinavke (Shi in sod., 2005), ter številna druga tkiva. Pristope za pripravo klinično uporabnih izdelkov regenerativne medicine lahko v grobem razdelimo v tri faze:

- zbiranje celic; lahko so avtologne ali alogene, embrionalne, odrasle ali specifične za določeno tkivo,
- izbor nosilca; nosilec je lahko naraven ali sintetičen, lahko je iz vlaken ali kapsul, lahko je hidrogel ali spužva,
- gojenje; lahko je statično ali dinamično z različnimi gojišči in faktorji (Vacanti in Langer, 1999).

Pristopi zdravljenja bolezni v sodobni medicini so uspešni za številna stanja. Vendar pa včasih samo stimulacija telesa in telesnih celic ni dovolj za okrevanje. Kadar gre za obolelo celotno tkivo, (npr. levkemija) in zaradi tega telo ne more samo od sebe okrevati, ali pa tkiva celo ni (npr. težji zlomi kosti), se obeta velik potencial za tkivno inženirstvo in regenerativno medicino. Z matičnimi celicami je namreč možno nadomestiti obolela in manjkajoča tkiva. Možno je tudi zdraviti poškodbe tkiv, ki se sama od sebe slabše regenerirajo (npr. živčno tkivo). Na razcvet v modernem času kaže tudi več kot 500 podjetij po vsem svetu, ki se ukvarjajo s tovrstnimi metodami zdravljenja (Parson, 2008).

Uporaba alogenih celic, tkiv in organov za zdravljenje nikakor ni moderen pristop. Transplantacija krvnih celic je v uporabi že več kot 200 let, prva transplantacija organa (ledvice) je bila opravljena že pred več kot 50 leti, transplantacija matičnih celic iz kostnega mozga pa že leta 1957 (Thomas in sod., 1957). Tovrstne transplantacije so izjemno učinkovite in so rešile številna življjenja. Njihov glavni problem je pomanjkanje darovalcev, saj morajo ti biti tkivno kompatibilni s prejemniki.

Vendar pa so se tehnike gojenja celic *in vitro* šele v zadnjem času razvile do stopnje, da omogočajo usmerjanje diferenciacije in s tem osnovo za tvorbo funkcionalnih tkiv in organov, ki bi bili primerni za transplantacijo. Poleg te aplikacije pa so matične celice pomembne v različnih bazičnih raziskavah, v raziskavah razvoja bolezni ter odzivov na zdravila (Burdick in Vunjak-Novaković, 2009).

Ena od ovir, ki jo je potrebno pri tkivnem inženirstvu premagati, je kontrolirana in usmerjena diferenciacija celic. To je natančno usmerjanje celic, da se ob pravem času in na pravem mestu diferencirajo v pravi fenotip. Na diferenciacijo celic v živem organizmu vplivajo številni dejavniki, kot so hormoni in rastni faktorji, ki delujejo v prostorskih in časovnih gradientih, medcelični stiki, sestava tridimenzionalnega (3D) okolja ter fizikalne (mehanske, električne) sile. Eden od osnovnih principov tkivnega inženirstva je v *in vitro* okolju kar se da natančno posnemati pogoje, ki jih ima določeno tkivo v organizmu skozi razvoj. Tak pristop imenujemo biomimetični pristop (Burdick in Vunjak-Novaković, 2009).

Matične celice lahko izoliramo iz različnih tkiv: Embrionalne matične celice (ESC) iz zgodnjih zarodkov, matične celice iz maščevja (ASC) iz maščobnega tkiva, krvotvorne in mezenhimske matične celice iz kostnega mozga. Različne matične celice se razlikujejo glede na svoje morfološke značilnosti, metode gojenja in diferenciacijski potencial. Za kontrolirano diferenciacijo je torej potrebno dejavnike prilagoditi tudi tipu matičnih celic.

Eden od teh dejavnikov, ki vplivajo na diferenciacijo matičnih celic, je tudi 3D okolje, v katerem se celice razvijajo (Vunjak-Novaković in sod., 2005). Še posebno je to pomembno pri inženiringu tkiv kot je hrustanec, kjer so medcelični stiki pomembni že od začetka diferenciacije. Ena od metod, kako iz mezenhimskih matičnih celic (MSC) pridobiti hrustančno tkivo je kultura peletov (Johnstone in sod., 1998). Po izolaciji MSC iz kostnega mozga so celice centrifugirali ter jih gojili v obliki peletov, ter dobili fenotip hrustančnega tkiva.

Tudi pri ESC je bilo že večkrat pokazano, da lahko 3D okolje vpliva na njihovo rast (Li in sod., 2006) in diferenciacijo (Gerecht-Nir in sod., 2004) ter celo vpliva na razvoj v različne celične tipe (Levenberg in sod., 2003). Med drugim se je za koristno izkazala tudi uporaba hidrogelov, kot so kolagen, alginat in hialuronska kislina (HA). Slednja je še posebej primerna za vzdrževanje nediferencirane kulture ESC, saj je prisotna izvenceličnem matriksu v blastocisti in je tako naravno okolje matičnim celicam (Gerecht in sod., 2007).

Izdelava proizvoda za celično terapijo, ki bi bil primeren za klinično rabo, hkrati pa ekonomsko smiseln, postavlja mnogo regulatornih in inženirskeh izzivov, ki se jih običajno ne lotevajo znanstveniki in raziskovalci. Ravno zaradi tega je pomembno, da se nove tehnologije tkivnega inženirstva integrirajo v izdelavo proizvodov na podlagi celičnih terapij, saj bo na tak način zagotovljena bolj nadzorovana celična identiteta, ponovljivost in učinkovitost, kar je pomembno za premagovanje regulatornih ovir (Kirovac in Zandstra, 2008).

## 1.1 HIPOTEZA

Naša delovna hipoteza je bila, da bo tridimenzionalno okolje zaustavilo rast in sprožilo diferenciacijo matičnih celic, na katero bomo lahko vplivali s sestavo izvenceličnega matriksa in gojišča. Namen našega dela je bil raziskati vpliv kolagena in HA kot možnih 3D nosilcev na rast in diferenciacijo humanih matičnih celic za potencialno uporabo v tkivnem inženirstvu.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 RAZLIČNI TIPI MATIČNIH CELIC

Matične celice so definirane kot celice, ki imajo sposobnost samoobnavljanja in zmožnost diferenciacije v različne celične tipe. V grobem jih delimo na embrionalne matične celice in matične celice odraslega. Kljub temu, da je trenutno poudarek na študijah embrionalnih matičnih celic, pa koncept matičnih celic ne izvira iz embriologije, temveč iz poskusov razumevanja tkivne homeostaze in obnavljanja, predvsem v hematopoetskem sistemu. Obstoječne celice v krvi je bil predlagan pred 100 leti (Maximow, 1909), prve temelje teorije o matičnih celicah pa je postavil Osgood (Osgood, 1957). Po njegovem naj bi mnogocelični organizmi imeli nerazvite celice, ki se lahko nesimetrično delijo v bolj diferencirano hčerinsko celico in kopijo starševske celice.

Raziskovalci so do danes uspeli izolirati matične celice iz številnih tkiv, ne le iz takih, kjer se celice pogosto delijo (npr. koža, kostni mozeg), temveč tudi iz drugih, kot je to živčni sistem (Gokhale in Andrews, 2006). Med mnogimi tipi matičnih celic obstajajo skupni signalni sistemi, kot so *Notch* in *Wnt*, vendar pa nekakšna skupna regulatorna tema še ni znana.

Med vsemi tipi matičnih celic so embrionalne matične celice edine, ki se jih v *in vitro* kulturi lahko vzdržuje neomejeno dolgo. Lahko se razvijejo v katero koli tkivo organizma in imajo s tem največjo potentnost - pluripotentnost. V splošnem velja, da bolj kot so celice diferencirane, manjšo potentnost kažejo (multipotentnost, unipotentnost). Vendar je izolacija hESC etično sporna, zato se povečuje število raziskav na drugih tipih odraslih matičnih celic. Odrasle matične celice imajo funkcijo homeostaze in obnavljanja tkiva. Sposobnost obnavljanja odraslih matičnih celic je običajno omejena na samo tkivo, v katerem je matična celica prisotna. Primer takih celic so hematopoetske matične celice v kostnem mozgu, ki se z delitvijo namnožijo v različne diferencirane celične tipe z namenom repopulacije krvnih celic (Kondo in sod., 2003):

Večine odraslih matičnih celic se ne da vzdrževati v *in vitro* kulturi, nekatere pa se da vsaj omejen čas. Take so nevralne matične celice (Price in Thurlow, 1988; Reynolds in Weiss, 1992) in mezenhimske matične celice (Friedenstein in sod., 1976; Conget in Minguell, 1999).

Mezenhimske matične celice (MSC) se lahko v različnih *in vitro* pogojih diferencirajo v različne celične tipe (slika 1). Z različnimi pogoji lahko izzovemo adipogenezo, miogenezo, hondogenezo, osteogenezo in tenogenezo (Shanti in sod., 2007). Poleg omenjenih razvojnih poti pa so raziskovalci uspeli diferencirati MSC v različne celične tipe vseh treh zarodnih plasti in na tak način pridobili celice, ki imajo podobne karakteristike kot ESC (Reyes in sod., 2001; Jiang in sod., 2002; Muguruma in sod., 2003). Imenujemo jih multipotentni odrasli progenitorji (MAPC). Dosegli so tako imenovano plastičnost celic, kar je z vidika tkivnega inženirstva zelo zaželeno. Običajno se MSC pridobiva z izolacijo iz kostnega mozga, vendar jih je možno pridobiti iz različnih tkiv. Tako so bile odkrite tudi hASC, MSC podobne celice, pridobljene z izolacijo iz liposukcije (Gimble in sod., 2007).

V tem diplomskem delu smo opazovali obnašanje hESC in hASC v 3D okolju.

### 2.1.1 Človeške embrionalne matične celice

Prve človeške embrionalne matične celice so bile izolirane leta 1998 (Thomson in sod., 1998). Izolirane so bile iz notranje celične mase (ICM) zarodka v stopnji blastociste. Uporabljeni zarodki so bili neuporabljen produkt *in vitro* fertilizacije (IVF), danes pa se uporablajo tudi postopki kloniranja; darovalka daruje jajčno celico, iz katere se odstrani jedro, ki se nadomesti z jedrom iz pacientove somatske celice. Blag električni tok nato sproži deljenje celice.

V zadnjem času so postale zanimive tudi inducirane pluripotentne matične celice (iPSC). Gre za navadne odrasle somatske celice, katerim se s transgeno vnese določene gene, ki se izražajo v matičnih celicah. Na tak način dobijo somatske celice lastnosti embrionalnih matičnih celic, kot so puripotentnost in samoobnavljanje. Podobne raziskave sta hkrati vodili dve raziskovalni skupini. Prva je v človeške fibroblaste vnesla gene Oct3/4, Sox2, Kif4 in c-Myc z retrovirusnim sistemom (Takahashi in sod., 2007). Druga skupina pa je uporabila gene Oct4, Sox2, Nanog in Lin28 z lentivirusnim sistemom (Yu in sod., 2007). Obe skupini sta prišli do zaključkov, da so tako dobljene celice zelo podobne ESC. Zaradi uporabe virusne transfekcije metoda ni primerna za klinično uporabo. V razvoju pa so tehnike, kjer je transfekcija mogoča samo s plazmidom, vendar so izkoristki toliko slabši (Okita in sod., 2008). Transgena je bila uporabljena tudi za usmerjeno diferenciacijo matičnih celic (Zwaka in Thomson, 2003).

ESC so pluripotentne, kar pomeni, da se lahko razvijejo v katero koli od treh zarodnih plasti. Pluripotentnost je želena lastnost v tkivnem inženirstvu, saj lahko tako z eno samo celično linijo tvorimo kompleksne organe, ki so sestavljeni iz celic več zarodnih plasti.

Preglednica 1: Tri zarodne plasti ter glavna tkiva in organi, ki se iz njih razvijejo.

Endoderm	Mezoderm	Ektoderm
Želodec	Skeletne mišice	Centralni živčni sistem
Črevo	Kosti	Leče oči
Jetra	Dermis	Nevroni
Trebušna slinavka	Vezivno tkivo	Pigmentne celice
Sečni mehur	Urogenitalni sistem	Vezivno tkivo v glavi
Pljuča	Srčno tkivo	Epidermis
Ščitnica in obščitnična žleza	Srce	Lasje
Žrelo	Kri in limfa	Sesalska žleza
	Vranica	Neuralni greben (zarodek)

ESC se danes za zdravljenje uporabljajo le v omejenem obsegu, saj obstajajo številne odprte etične in znanstvene dileme. Nediferencirane ESC po implantaciji tvorijo teratome, prav tako pa ni jasna stabilnost fenotipa predniških ter diferenciranih celic, pridobljenih iz ESC (Hoffman in Carpenter, 2005).

Trenutno je podjetje Geron edino na svetu, ki mu je ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) odobrila klinično študijo na ljudeh. Njihovo zdravilo temelji na vbrizgu oligodendrocytih predniških celic, pridobljenih z diferenciacijo hESC, na mesto poškodbe hrbtenjače. Celice se na mestu poškodbe pritrđijo in začnejo proizvajati lastno mielinisko

ovojnico, s katero izolirajo živce in ponovno vzpostavijo prenos živčnega signala preko nevronov (Geron, 2009).

#### 2.1.1.1 Fenotip in morfologija

Da klinično dokažemo, da imamo v kulturi nediferencirane, pluripotentne ESC, je potrebno dokazati naslednje:

- Antigeni na celični površini (najbolj značilni, določa se jih imunološko):
  - Stage-specific Embryonic Antigen 3 in 4 (SSEA3, SSEA4) (glikolipidi)
  - GCTM2, GCTM343, TRA-1-60, TRA-1-81 (keratan-sulfati)
  - TRA-2-49, TRA-2-54 (alkalna fosfataza iz jeter)
  - Thy1
  - CD9
  - HLA-1
- Ekspresija genov (najbolj značilni, mRNA analiza):
  - NANOG
  - POU5F1 (Oktamer 4 oz. Oct4)
  - Rastni faktor iz teratomov (TDGF)
- Epigenetske spremembe
  - metilacija in posledično monoalelno izražanje nekaterih genov (IPW, SNRPN, KCNQ1DT1, PEG3)
  - v ženskih linijah X-kromosom ni inaktiviran, inaktivacija X-kromosoma je značilna za začetek diferenciacije
- Tumorji po ksenotransplantaciji (transplantacija v X-SCID miške)
  - nastanek teratomov, benignih tumorjev, ki vsebujejo vse tri tipe zarodnih plasti
- Mikrobiološka neoporečnost FL in same suspenzije s hESC
  - bakterije (med njimi tudi mikoplazme)
  - glive
  - virusi
- Stabilen kariotip

Človeške embrionalne matične celice so pluripotentne in se lahko diferencirajo v katerega koli izmed 200 celičnih tipov v človeškem telesu (Meng in sod., 2007) Kadar se matične celice presadi iz njihovega naravnega okolja v novo mikrookolje, pridobijo lastnosti novega okolja. Sposobne so prevzeti fenotip, ki ustreza takemu okolju, se spremeniti v tkivne matične celice z značilnimi lastnostmi in specializiranim delovanjem. V določenih primerih tkivne matične celice lahko celo preskočijo iz ene zarodne plasti v drugo; govorimo o plastičnosti celic (Strbad in Rožman, 2005; Zipori, 2005).

### 2.1.1.2 Hranilna plast

ESC potrebujejo ustrezne rastne faktorje, citokine in substrat za pritrditev, da ostanejo v nediferenciranem stanju. Običajno gojenje ESC poteka na hranilni plasti (FL), embrionalnih mišjih fibroblastov (mEF). Možno je FL tudi nadomestiti s posameznimi komponentami izvenceličnega matriksa, vendar je to težje in dražje.

Odkrili so (Amit in sod., 2004), da ESC lahko ohranijo nediferencirano stanje, pluripotentnost in sposobnost samoobnavljanja brez FL, če jim dodamo naslednje molekule:

- transformirajoči rastni faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1)
- Levkemija inhibitorni dejavnik (LIF)
- osnovni rastni faktor fibroblastov (bFGF)
- fibronektin (je del izvenceličnega matriksa, nanj se celice pripenjajo, pomemben signal za ESC, da ostanejo nediferencirane)

Namesto na mEF, lahko celice gojimo v gojišču, predhodno inkubiranem na hranilni plasti (mEF-CM), na substratu, ki vsebuje naslednje komponente:

- Matrigel
- laminin
- fibronektin
- človeški serum.

### 2.1.2 Matične celice iz maščevja

Leta 2000 so prvič uspeli pridobiti celice iz lipoaspiratov s podobnimi karakteristikami kot MSC (Zuk in sod., 2001).

Raziskovalci so odkrili številne mehanizme s katerimi ASC popravljajo in regenerirajo tkiva (Gimble in sod., 2007). Prvi tak mehanizem je izločanje citokinov in rastnih faktorjev na mestu poškodbe in tako na parakrini način stimulirajo obnavljanje tkiva. Prav tako se lahko diferencirajo v enega izmed celičnih tipov, ki je potreben na mestu poškodbe, hkrati pa izločajo antioksidante in šaperone, da zaščitijo poškodovano mesto pred toksičnimi substancami. Igrajo torej pomembno vlogo pri popravljanju tkiva.

Matične celice iz maščobnega tkiva so obetavne zaradi lahke dostopnosti, številčnosti ter multipotentnosti. Mogoče jih je namreč izolirati iz lipoaspiratov, zavrnjenega tkiva liposukcije, ki je danes pogost postopek v lepotni medicini. Plastični kirurg s kanilo prepoji maščobno tkivo s fiziološko raztopino, nato pa jo skupaj s koščki tkiva odstrani. V odstranjenem tkivu se nahajajo adherentne stromalne celice z značilnostmi predniških celic maščobnih celic. Od ostalega tkiva se jih loči s centrifugiranjem pri 1200 G

ASC so tkivne celice in se od ESC bistveno razlikujejo. Osnovne razlike so:

- multipotentnost (mezodermalni celični tipi),
- nahajajo se v velikem številu v primerjavi s podobnimi multipotentnimi celicami v kostnem mozgu,
- preprosta izolacija,
- nizka telomerazna aktivnost in posledično hiter zapad v senescenco,

- po implantaciji ne tvorijo teratomov,
- možnost avtologne uporabe,
- njihova uporaba ni etično sporna.

#### 2.1.2.1 Fenotip in morfologija

Direktna primerjava med imunofenotipi humanih matičnih celic iz maščobe in humanih mezenhimskih matičnih celic je pokazala več kot 90% podobnost (Gimble in sod., 2007). Z imunskimi tehnikami so ugotovili, da hASC na površini izražajo:

- molekule za pripenjanje
  - CD9 (tetraspan)
  - CD29 ( $\beta$ 1 integrin)
  - CD49 ( $\alpha$ 4 integrin)
  - CD54 (ICAM-1)
  - CD105 (endoglin)
  - CD166 (ALCAM)
- receptorske molekule
  - CD44 (hialuronat)
  - CD71 (transferin)
- encime
  - CD10 (common acute lymphocytic leukemia antigen)
  - CD13 (aminopeptidaza)
  - CD73 (5' ektonukleotidaza)
  - aldehid dehidrogenaza
- molekule izvenceličnega matriksa
  - CD90 (Thy1)
  - CD146 (Muc18)
  - kolagen tipa I in III
  - osteopontin
  - osteonektin
- citoskelet
  - aktin  $\alpha$ -gladkih mišic
  - vimentin
- molekule komplementne kaskade
  - CD55 (dejavnik pospeševanja propada)
  - CD59 (protektin)
- histokompatibilne antigene A, B, C
- molekule, značilne za matične celice
  - CD34
  - ABCG2

- molekule, značilne za stromalne celice
  - CD29
  - CD44
  - CD73
  - CD90
  - CD166

S tehniko mikromrež je bilo ugotovljeno, da izražajo označevalce Oct4, Rex1 in Sox2 (Izadpanah in sod., 2006).

hASC imajo tudi potencial diferenciacije v različne celične tipe ob dodatku ustreznih faktorjev.

## 2.2 OBIČAJNI PRISTOPI K DIFERENCIACIJI MATIČNIH CELIC

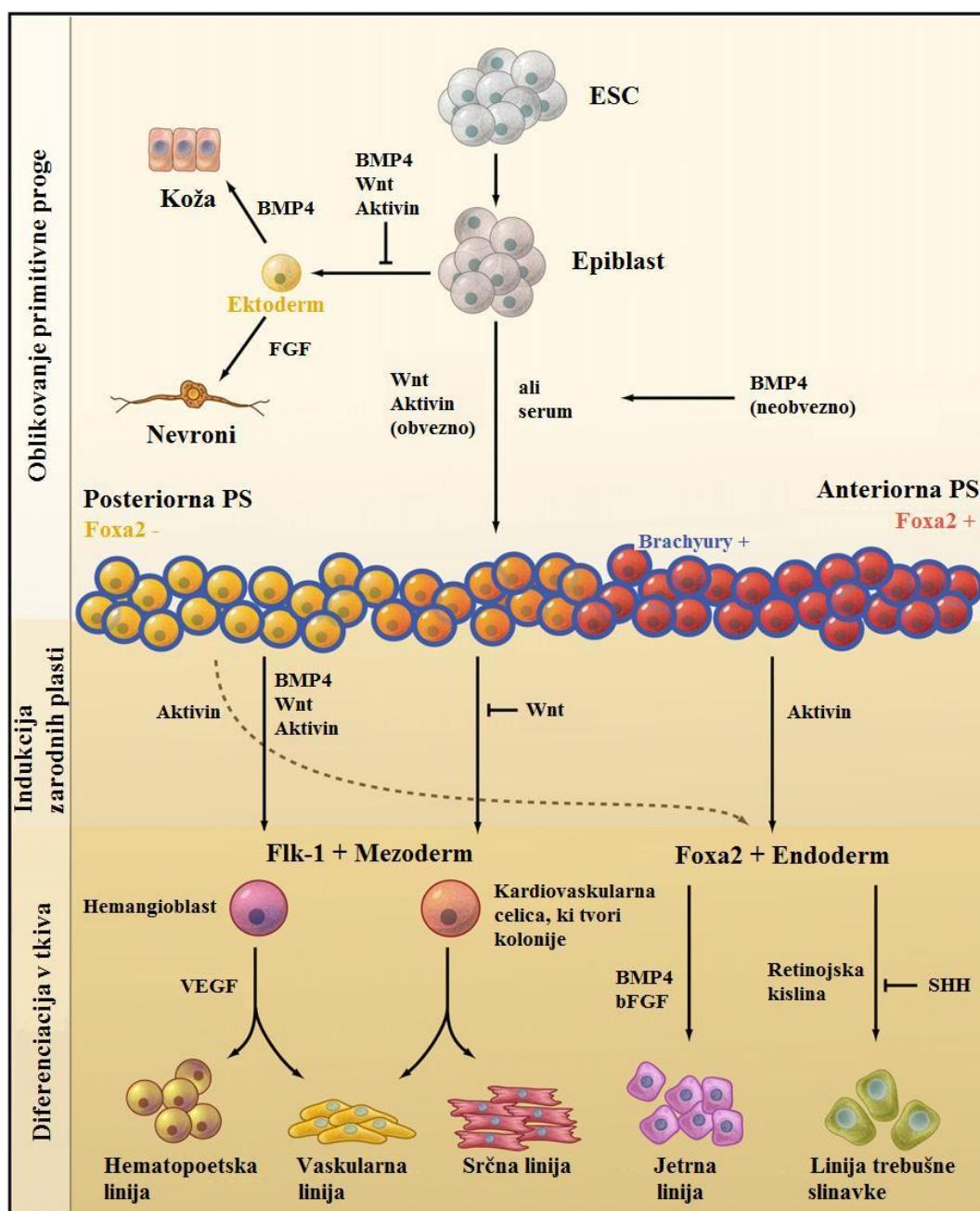
Običajni postopki diferenciacije matičnih celic temeljijo na dodatku različnih rastnih in drugih dejavnikov v gojišče, ki po korakih usmerjajo celice v določen celični tip.

### 2.2.1 Diferenciacija ESC

Dejavniki, ki so bili do sedaj uporabljeni za diferenciacijo ESC, so številni. Poleg tega imajo dejavniki lahko različne efekte, odvisno od koncentracije, v kateri so prisotni v gojišču, ali pa od faze, v kateri so celice. Pokazali so tudi, da imajo isti dejavniki različne učinke v različnih vrstah, hkrati pa tudi celice v različnih vrstah kažejo različne označevalce (Gokhale in Andrews, 2006).

Preglednica 2: Rastni faktorji in vpliv, ki ga imajo na hESC.

Kratica	Funkcija	Referanca
<b>bFGF</b>	Ohranjanje v nediferenciranem stanju	Xu in sod., 2005
<b>LIF</b>	Ohranjanje v nediferenciranem stanju	Amit in sod., 2004
<b>BMP</b>	Spodbuja diferenciacijo v trofoblast	Xu in sod., 2002
<b>Aktivin A</b>	Primitivna proga, endoderm, mezoderm	Kubo in sod., 2004
<b>VEGF</b>	Mezoderm - eritropoeza	Cerdan in sod., 2004
<b>DKK1</b>	Wnt inhibitor - mezoderm	Murry in Keller, 2008
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Nevroektoderm	Smith in sod., 2008
<b>Wnt-3a</b>	Primitivna proga, aktivacija Wnt	Liu in sod., 1999



Slika 1: Shematičen prikaz razvojnih poti matičnih celic (Murry in Keller, 2008: 663). Z različnimi rastnimi faktorji se lahko matične celice diferencirajo v različne celične tipe. V kateri tip so se diferencirale sklepamo na podlagi površinskih označevalcev in genov, ki jih izražajo in so specifični za določen celični tip.

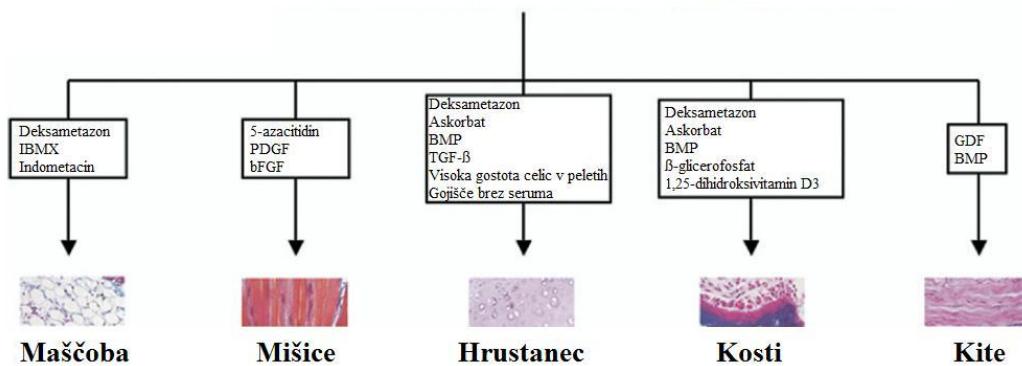
### 2.2.2 Diferenciacija ASC

ASC so se sposobne diferencirati v različne celične tipe. Običajni postopki diferenciacije tudi pri ASC vključujejo različne dejavnike, ki se jih doda z gojiščem. Nekateri dejavniki se razlikujejo od tistih pri ESC, drugi so podobni, vsekakor pa raziskovalci uporabljajo različne kombinacije dejavnikov.

Preglednica 3: Diferenciacijski potencial hASC ter faktorji, ki inducirajo diferenciacijo v določen celični tip (Gimble in sod., 2007: 1253).

Celični tip	Faktorji indukcije
<b>Adipociti</b>	Deksametazon, izobutil metilksantin, indomeracin, inzulin, tiazolidinedion
<b>Kardiomiociti</b>	Transferin, Interlevkin 3 in 6 (IL-3, IL-6), rastni faktor žilnega endotelija (VEGF)
<b>Hondrocyti</b>	Askorbinska kislina, protein kostne morfogeneze 6, deksametazon, inzulin, TGF-β
<b>Endotelij</b>	Medij EGM-2-MV (Cambrex) z askorbatom, epidermalnim rastnim faktorjem, bFGF, hidrokortizon
<b>Miociti</b>	Deksametazon, konjski serum
<b>Celice, podobne nevronom</b>	Butiliran hidrokianizol, valproična kislina, inzulin
<b>Osteoblasti</b>	Askorbinska kislina, protein kostne morfogeneze 6, deksametazon, 1,25 dihidroksivitamin D3

### Mezenhimske matične celice



Slika 2: Različna tkiva, v katera je možno usmeriti diferenciacijo hASC (Shanti in sod., 2007: 1642).

#### 2.2.3 Genetski profil celičnih tipov

Eden od načinov preverjanja, v kateri tip tkiva so se celice diferencirale, je analiza izražanja genov z metodo PCR v realnem času.

Preglednica 4: Geni, značilni za določeno zarodno plast in celični tip. Celice, ki se diferencirajo v določen celični tip, imajo povečano izražanje ustreznih genov, izražanje ostalih pa imajo zmanjšano.

Celični tip	Značilni gen	Referenca
<b>Pluripotentnost</b>	Oct4, Sox2	Kirouac in Zandstra, 2008
<b>Endoderm</b>	Sox17, Foxa2	Nakanishi in sod., 2008
<b>Mezoderm</b>	Brachyury, Foxa2	Nakanishi in sod., 2008
<b>Ektoderm</b>	Pax6	Bauwens in sod., 2008
<b>Mezodermalni celični tip</b>		
<b>Kost</b>	CBFA1	Hwang in sod., 2006
<b>Hrustanec</b>	Sox9	Hwang in sod., 2006
<b>Maščoba</b>	PPAR	Gimble in sod., 2007

## 2.3 DIFERENCIACIJA MATIČNIH CELIC V 3D OKOLJU

V živem organizmu so celice obkrožene in pritrjene na izvencelični matriks, ki določa strukturo in biomehaniko ter vpliva na signalizacijo določenega celičnega mikrookolja. Tako vnos hrani, kot odstranjevanje metabolitov potekata v večini tkiv s kapilarnim sistemom. Poleg tega na celične procese vplivajo hidrodinamski, mehanski in električni dejavniki ter njihove časovne in prostorske kombinacije.

Ravno zaradi tega je nemogoče pričakovati, da bi lahko v dvodimenzionalnih (2D) laboratorijskih sistemih gojenja celic dovolj dobro posnemali njihovo naravno okolje. Zanimivo je, da so to prvi spoznali raziskovalci raka (Weaver in sod., 1997) ter tkivni inženirji (Griffith in Swartz, 2006; Radisic in sod., 2007), šele nato raziskovalci matičnih celic (Xie in Spradling, 2000; Kiger in sod., 2001).

Da bi bilo mogoče izkoristiti celoten potencial matičnih celic, kot je obnavljanje, diferenciacija ter sestavljanje novih tkiv *in vitro*, bi bilo potrebno usmerjati 3D rast celic ter vzpostaviti takšne pogoje, kot jih imajo te celice tekom razvoja *in vivo*. Ta pristop temelji na predpostavki, da so odzivi celic na okoljske dejavnike predvidljivi in da se celice na dejavnike v živem organizmu in v laboratoriju odzivajo enako (Burdick in Vunjak-Novaković, 2009).

Študije so pokazale, da lahko z gojenjem celic na bioloških materialih, ki predstavljajo nosilce za pritrditev celic ter matrico za izgradnjo nadomestnega tkiva, simuliramo naravno celično okolje. Med take materiale spadajo hidrogeli (Gerecht-Nir in sod., 2004), sružve iz polimerov (Martin in sod., 2001), lahko pa so tudi inovativni materiali, kot so to nosilci iz svile (Marolt in sod., 2006).

S tremi glavnimi pristopi lahko posnemamo različne aspekte rasti celic v 3D okolju;

- formacija celičnih skupkov (EB, mikromase, peleti) – medcelični kontakti,
- gojenje na 3D nosilcih – kontakti z izvenceličnim matriksom ter tridimenzionalna struktura,
- gojenje v bioreaktorjih – mehanske sile, električne sile, povečan transport snovi.

### 2.3.1 Celični skupki

Najbolj osnovni izmed principov gojenja v 3D okolju je formacija celičnih skupkov. Če se na tak način goji embrionalne matične celice iz takega skupka lahko nastane embrioidno telesce (EB) (Itskovitz-Eldor in sod., 2000). V njem se celice diferencirajo v celične tipe vseh treh zarodnih plasti. Protokoli formacije EB temeljijo na sprostitvi kolonij hESC iz plasti mišjih mitotsko inaktiviranih fibroblastov (mEF), bodisi encimsko bodisi mehansko s strgalom. Nato se skupke presadi v gojilne posode ali epruvete, ki preprečujejo pritrditev, in se jih goji v suspenziji, kjer celice formirajo 3D tkivne strukture. Te strukture so podobne začetnim fazam v razvoju zarodka.

Glavni problem pri formaciji EB je težko pridobivanje homogenih teles. Ker izhajajo iz različno velikih kolonij, je tudi njihova končna velikost različna. Prav tako večina teh kolonij ne izvira iz ene same celice, kar pomeni, da celice v istem EB niso genetsko

identične (niso kloni), lahko pa je EB zaradi agregacije sestavljen tudi iz več različnih kolonij. Zaradi tega je diferenciacija v takih aggregatih hESC večinoma kaotična in neorganizirana, z velikimi odstopanjimi med posameznimi aggregati (Itskovitz-Eldor in sod., 2000; Weitzer, 2006). Tak pristop omejuje študije embrionalnega razvoja človeka, in je neprimeren za učinkovito pridobivanje delno diferenciranih (predniških) celic.

Pojavljajo se nove tehnologije, s katerimi se je mogoče izogniti zgoraj omenjenim nehomogenostim. Pri hESC ni mogoče uporabiti posamezne celice za formacijo EB, potrebni so skupki vsaj nekaj celic, ki imajo lahko že predhodno organizacijo (Yoon in sod., 2006). Novi protokoli temeljijo na naključnem združevanju posameznih celic s centrifugiranjem (Ng in sod., 2005). Na ta način je mogoče zagotoviti večjo homogenost EB, tako po morfologiji kot po diferenciaciji med posameznimi EB. Protokol je bil tudi prirejen za produkcijo velikega števila homogenih EB, kar je pomembno za statistično zanesljive rezultate (Ungrin in sod., 2008).

Odrasle matične celice ne tvorijo EB, kadar jih gojimo v skupkih. Vseeno pa kažejo zanimivo morfologijo, kadar rastejo v kulturah mikromas (skupkov celic pripetih na gojilno posodo) ali v peletih, saj ta način rasti omogoča tesne medcelične stike, kot je to značilno za nekatera tkiva v času razvoja. Že pred več kot desetimi leti so si na tak način pomagali pridobiti tkivo z morfologijo podobno hrustančnemu tkivu, saj so celice začele izločati kolagen (Johnstone in sod., 1998). Kulture celičnih skupkov so dobili tako, da so po 200.000 MSC, izoliranih iz kostnega mozga centrifugirali pri 500G in celične pelete nato gojili v DMEM z definiranim nadomestkom FBS. Gajenje MSC v skupkih očitno aktivira hondogenezo.

### 2.3.2 Nosilci

Če želimo matične celice uporabiti v terapevtske namene, jih moramo znati zelo natančno usmeriti proti določenemu celičnemu tipu. Pristopi za dosego te usmerjene diferenciacije so različni, eden izmed njih je uporaba 3D celičnih nosilcev.

Pomembna komponenta mikrookolja matične celice je njen izvencelični matriks, ki vključuje številne kemične in biofizične signale. V naravnem okolju ta matriks sestoji iz kolagenov, drugih proteinov, polisaharidov in vode. Njegova struktura temelji na lokaciji in funkciji tkiva. Hrustanec ima visoko vsebnost proteoglikanov znotraj močnega kolagenskega ogrodja. Tak matriks daje tkivu njegove pomembne mehanske lastnosti, da lahko zdrži obremenitve. Drugače pa je pri tkivu kit; matriks je tukaj neenakomeren in ima drugačne mehanske lastnosti v različnih smereh.

Različni proteini in peptidi v izvenceličnem matriksu uravnavajo medcelično komunikacijo in vezave na receptorje. Poleg tega pa lahko sama struktura in mehanske značilnosti matriksa vplivajo na diferenciacijo matičnih celic. To lahko izkoristimo z *in vitro* sintezo matriksa ter na ta način usmerjamo diferenciacijo matičnih celic. Ravno napredek na področju sinteze materialov je odprl številne možnosti uporabe materialov v ta namen, tako sintetičnih kot naravnih. V grobem lahko celične nosilce, izdelane iz takih materialov, razdelimo na porozne nosilce, vlknaste nosilce in hidrogele (Nair in Laurencin, 2007). Porozni nosilci imajo makroskopske vdolbinice, v katere se celice nasadijo. Vlknasti

nositci so podobni naravnemu tkivu, možno pa je tudi usmerjati celično rast. Hidrogeli so polimeri, ki absorbirajo vodo in so prisotni tudi v naravnih izvenceličnih matriksih. Matične celice, gojene v 2D ali 3D okolju imajo bistvene morfološke in fenotipske razlike. Okolje lahko torej veliko prispeva k diferenciaciji matičnih celic.

### 2.3.2.1 Ohranjanje hESC v nediferenciranem stanju v hidrogelu

Eden od razlogov, zakaj je tako težko usmeriti diferenciacijo matičnih celic, je uporaba slabo definiranih živalskih komponent pri gojenju, ki ne posnemajo naravnega celičnega mikrookolja. Po drugi strani klasični protokoli diferenciacije hESC temeljijo uporabi mEF, FBS in nato formacije EB, kar vnaša variabilnost med poskuse. Zaradi tega je bolj primerno uporabljati hidrogele kot dobro definiran matriks tako za ohranjanje hESC v nediferenciranem stanju, kot tudi za diferenciacijo v različne celične tipe (Gerecht in sod., 2007). Kot hidrogel so uporabili hialuronsko kislino (HA), saj je ta prisotna v prvih fazah embrionalnega razvoja v blastocisti. HA tako omogoča naravno okolje hESC. hESC so ujeli v HA tako, da so jih suspendirali v tekočo suspenzijo, nato pa izpostavili UV svetlobi 10 min. Celice, ujete v HA, so nato gojili potopljene v gojišču, na dnu posode pa so bili prisotni tudi mEF, ki so s svojimi faktorji ohranjali celice v nediferenciranem stanju. Pokazali so, da lahko hESC, ujete v HA, preživijo nediferencirane, genetsko stabilne in ohranajo diferenciacijski potencial. Predvidevali so, da bi z dodatkom ustreznih rastnih faktorjev v gojišče uspeli izzvati tudi usmerjeno diferenciacijo. Pokazali so tudi, da 10 minutna izpostavljenost UV svetlobi ne vpliva signifikantno na poškodbe DNA.

### 2.3.2.2 Diferenciacija matičnih celic na 3D nosilcih

Leta 2001 je bila narejena raziskava, v kateri so na zelo poroznih, strukturno stabilnih spužvastih polimerih gojili stromalne celice iz kostnega mozga govedi (Martin in sod., 2001). Za izdelavo nosilcev so uporabili polilaktično koglikolično kislino in polietilen glikol. Uporabili so dve različni gojišči, tako ki spodbuja diferenciacijo v kostni celični tip (gojišče je vsebovalo deksametazon in  $\beta$ -glicerolfosfat) ter tako, ki spodbuja diferenciacijo v hrustančni celični tip (gojišče je vsebovalo deksametazon, inzulin in TGF- $\beta$ 1). Po štirih tednih kultivacije je celice obdajal izvencelični matriks z lastnostmi bodisi kostnega, bodisi hrustančnega izvenceličnega matriksa. Zaključili so, da lahko z uporabo sintetičnih polimerov dobro simuliramo razvoj mezenhimskih tkiv *in vitro*.

Pet let po tem je bila objavljena raziskava, ki je poskušala na podoben način prikazati uporabo celičnih nosilcev. Tokrat so uporabili svilnate nosilce, človeške stromalne celice iz kostnega mozga pa so gojili v rotirajočem bioreaktorju (Marolt in sod., 2006). Prav tako so za gojenje uporabili dve različni gojišči, eno je spodbujalo diferenciacijo v kostno tkivo drugo pa v hrustančno. Celični konstrukti so se med sabo bistveno razlikovali, saj so tisti, gojeni v mediju, ki stimulira osteogenezo, kazali visoko stopnjo mineralizacije. Uspelo jim je sintetizirati relativno velike celične konstrukte; diske premera 8 mm in debeline 2 mm.

Leta 2007 objavljena raziskava je uporabila 3D nosilce za diferenciacijo mišjih embrionalnih matičnih celic v hrustančni celični tip (Hwang in sod., 2007). Ugotovili so, da 3D nosilci pri taki diferenciaciji igrajo pomembno vlogo, ne le za pripenjanje celic, temveč tudi kot bioaktivni signal za celice pri njihovi diferenciaciji. Z enkapsulacijo ESC v

obliki embrioidnih telesc v različne hidrogele so uspeli pokazati uporabnost hidrogelov za ta namen.

#### 2.3.2.3 Diferenciacija matičnih celic z enkapsulacijo regulatornih faktorjev

Z novimi tehnologijami, ki omogočajo ujetje rastnih in regulatornih faktorjev v sam hidrogel, je raziskovalcem uspelo doseči višjo stopnjo diferenciacije hESC kot na klasične načine z EB. V obeh primerih so uporabili RGD peptid in VEGF, oba dejavnika, ki stimulirata diferenciacijo v vaskularni tip. Kot hidrogel so uporabili dekstran. Zaključili so, da uporaba dekstrana v ta namen lahko pripomore k diferenciaciji hESC, še posebej v endodermalne celične tipe.

Podoben poskus so naredili tudi z mezenhimskimi matičnimi celicami (MSC). Kot že omenjeno, so bili polisaharidi, kot je HA, uporabni kot celični nosilci v različnih aplikacijah. HA je prisotna v telesu in regulira kar nekaj celičnih procesov, kot je proliferacija in migracija celic. Prav tako razgradni produkti HA lahko vplivajo inhibitorno. Sintetizirali pa so tudi že take HA hidrogele, ki jih lahko celice razgrajujejo same in tako skozi čas sproščajo rastne faktorje in na ta način vplivajo na diferenciacijo (Sahoo in sod., 2008). Avtorji so zaključili, da imajo hidrogeli, kot je HA, potencial, da postanejo pomembni pripomočki pri produkciji celičnih pripravkov v regenerativni medicini.

Različni regulatorni faktorji in njihove kombinacije, ki se preučujejo za učinkovito pridobivanje predniških celic mezodermalnih tkiv, so predstavljeni v preglednici 3.

#### 2.3.2.4 Gojenje in diferenciacija hESC v kolagenu

Ugotovili so, da je tudi kolagen primeren kot 3D nosilec za diferenciacijo hESC v tipe mezoderma (Gerecht-Nir in sod., 2003). Celice so najprej kot 2D kulturo gojili v mediju, ki spodbuja vaskularizacijo. Njihov pristop je temeljal na treh pomembnih faktorjih:

- celice so gojili posamezno, da bi preprečili kakršnokoli agregacijo in spontano diferenciacijo (kot je to v EB),
- uporabili so specifično nasaditveno gostoto celic in jih gojili v mediju za vaskularizacijo,
- za 3D nosilec so uporabili kolagen.

Avtorji so zaključili, da hESC in kolagen kot 3D nosilec lahko služijo za študije zgodnje embriogeneze.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIALI IN APARATURE

##### 3.1.1 Kemikalije in plastični pripomočki

Preglednica 5: Seznam glavnih kemikalij in plastičnih pripomočkov, ki smo jih uporabljali za izvedbo poskusov.

Okrajšava	Celo ime	Podjetje	Številka proizvoda
<b>Aktivin A</b>	Rekombinantni aktivin A (človek/miš/podgana)	RDSystems	338-AC-005/CF
<b>bFGF</b>	Osnovni fibroblastni rastni faktor (basic fibroblast growth factor)	Invitrogen	13256-029
<b>BMP-4</b>	Rekombinantni protein kostne morfogeneze 4 (BMP-4), človeški	RDSystems	314-BP-010/CF
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI, dilactate)	Invitrogen	D3571
<b>DMEM</b>	Dulbeccovo modificirano gojišče (Dulbecco's modified Eagle medium) - bogato z glukozo (high glucose)	Invitrogen	11965
<b>DMSO</b>	Dimetyl sulfoksid (Dymethyl sulfoxide)	Sigma - Aldrich	D2438
<b>DPBS</b>	Slana fosfatna puferska raztopina (phosphate buffered saline) brez MgCl <sub>2</sub> in CaCl <sub>2</sub>	Invitrogen	14190
<b>EDTA</b>	Suspenzija etilendiamintetraocetne kisline	Fluka	3690
<b>Epruvete</b>	15 in 50 mL, stožčasto dno	Falcon	352074(95)
<b>Etanol</b>	Etanol 200 proof, brez DNaz in RNaz	Sigma - Aldrich	E7023
<b>Formaldehid</b>	Raztopina formaldehida, 37%	Sigma - Aldrich	533998
<b>Fotoiniciator</b>	Irgacure 2959	Ciba	0298913AB
<b>Gojilne posode</b>	75 cm <sup>2</sup> , 250 mL, s filtrom v zamašku, polistiren	Falcon	353136
<b>Gojilne posode s 6 vdolbinicami</b>	9,6 cm <sup>2</sup> , sterilne, polistiren	Falcon	353502
<b>HA</b>	Hialuronska kislina	Sigma - Aldrich	H9649-1MG
<b>Izopropanol</b>	Izopropil alkohol, tudi 2-propanol, brez DNaz in RNaz	Sigma - Aldrich	I9516
<b>Kloroform</b>	Kloroform, brez DNaz in RNaz	Sigma - Aldrich	496189
<b>KO-DMEM</b>	"knock-out" Dulbeccovo modificirano gojišče	Invitrogen	10829
<b>KO-nadomestek seruma</b>	»knock-out« Serum Replacement, sestava: mL L-glutamin 1 mM, 2-merkaptoetanol 0,1 mM, neesencialne aminokisline 1%	Invitrogen	10828-028

Se nadaljuje

### Nadaljevanje

Okrajšava	Celo ime	Podjetje	Številka proizvoda
<b>Kolagen</b>	Kolagen 3,89 mg/µL	BD Biosciences	354236
<b>Kolagenaza</b>	Kolagenaza	Invitrogen	17104-019
<b>Live/Dead</b>	LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit	Molecular probes	L-3224
<b>Mikrocentrifugirke</b>	Prozorne 1,5 mL mikrocentrifugirne epruvete	Eppendorf	22364111
<b>Mikrotiter plošče</b>	Plošče s 96 vdolbinicami	Costar	2797
<b>Mikrotiter plošče za fluorescenco</b>	Plošče s 96 vdolbinicami, temne stene, ravno dno	Costar	3694
<b>NaOH</b>	Natrijev hidroksid	Sigma - Aldrich	S8045
<b>Normalni konjski serum</b>	normalni konjski serum (normal horse serum)	Vector	S-2000
<b>PBS 10x</b>	Slana fosfatna puferska raztopina (phosphate buffered saline), desetkrat koncentrirana	Invitrogen	70011
<b>Penstrep</b>	Penicilin in streptomicin	Invitrogen	15140
<b>Proteinaza K</b>	Serinska proteinaza širokega spektra	Fischer BioReagnets	BP1700-100
<b>Quant-iT Picogreen</b>	Kit za določanje koncentracije dvoverižne DNA "Quant-iT PicoGreen dsDNA kit"	Invitrogen	P7589
<b>Quant-iT RNA</b>	Quant-iT RNA Broad Range assay kit	Invitrogen	Q10210
<b>RNAse Zap</b>	Sprej proti RNAzam	Ambion	AM9780
<b>RPMI</b>	Gojišče "Roswell Park Memorial Institute"	Invitrogen	11835
<b>RT-PCR kit</b>	Komplet za reverzno transkripcijo "SuperScript III First-Strand"	Invitrogen	18080-051
<b>StemPro</b>	StemPro®-34 SFM 1x, tekočina	Invitrogen	10639-011
<b>Tripan</b>	Tripansko modrilo (Trypan Blue Solution)	Sigma - Aldrich	T8154
<b>Tripsin</b>	Raztopina tripsina 0,25% v EDTA	Invitrogen	25200
<b>Tris</b>	10mM Tris-HCL v 1mM EDTA, pH 7,4	Fluka	93302
<b>Triton</b>	Triton X-100	Sigma - Aldrich - Aldrich	X100-500ML
<b>TRIzol reagent</b>	TRIzol reagent za izolacijo RNA	Invitrogen	15596-018
<b>Voda</b>	Voda brez DNaz in RNaz	Fischer Scientific	BP561-1
<b>Wnt-3a</b>	Rekombinantni Wnt-3a, človeški	RDSystems	5036-WN-010/CF
<b>XTT kit</b>	Tetrazolijeva sol za toksikološko testiranje "In Vitro Toxicology Assay Kit XTT Based"	Sigma - Aldrich	TOX-2

### 3.1.2 Aparature

Preglednica 6: Seznam aparatur, ki smo jih uporabljali za izvedbo poskusov.

Aparatura	Podjetje
<b>Centrifuga, model 5804R, model 5415R</b>	Eppendorf
<b>Inkubator Heracell 150</b>	Thermo/Fischer Scientific
<b>Svetlobni mikroskop CKX31</b>	Olympus
<b>Fazno kontrastni fluorescentni mikroskop, model IX81</b>	Olympus
<b>Avtomatske pipete 1-10 vL, 10-100 vL in 100-1000 vL</b>	Eppendorf
<b>Pipetor</b>	Drummond
<b>Fluorimeter Qubit</b>	Invitrogen
<b>Vodna kopel Isotemp 210</b>	Fischer Scientific
<b>Ciklični termostat za qPCR, ABI PRISM® model HT7900</b>	Applied Biosystems
<b>Ciklični termostat za PCR, model MyCycler</b>	BioRad
<b>Spektrofotometer SpectraMax Plus</b>	Molecular Devices
<b>Vibracijski mešalnik</b>	Fischer Scientific
<b>Avtoklav, model 2540E</b>	Tuttnauer Brinkmann
<b>Fluorimeter FLX800</b>	BioTek
<b>Števna komora (Counting chamber) 3200</b>	Hausser Scientific Partnership
<b>UV žarnice, tip: F8T5/BL, 352 nm, UV moč = 1,2 W</b>	Siko

### 3.1.3 Gojišča in pufri

Preglednica 7: Seznam gojišč, ki smo jih uporabljali za gojenje celic in njihova sestava.

Kratica	Gojišče	Sestava
<b>DFB</b>	DMEM + FBS + bFGF	DMEM 90%, FBS 10%, bFGF 1ng/mL
<b>DF</b>	DMEM + FBS + Penstrep	DMEM 89%, FBS 10%, 1% Penstrp
<b>KOD</b>	Gojišče za hESC	KO-DMEM 80%, KO-nadomestek seruma 20%,
<b>KODB</b>	KOD + bFGF	KO-DMEM 80%, KO-nadomestek seruma 20%, bFGF 4 ng/mL
<b>SP0</b>	StemPro brez dodatkov	StemPro®-34 SFM
<b>SPS</b>	StemPro Stepwise	Dan 0: BMP4 0,5 ng/mL, dan 1-7: BMP4 10 ng/mL, bFGF 5 ng/mL, Aktivin A 3 ng/mL
<b>SPW</b>	StemPro + Wnt3G	Gojišče + Wnt-3a 50 ng/mL
<b>SPA</b>	StemPro + Aktivin A	Gojišče + Aktivin A 50 ng/mL
<b>Kolagen</b>	Kapljica kolagenskega nosilca	Kolagen 3 mg/mL v PBS, NaOH 1,8%
<b>TEX</b>	TEX pufer	10 mM Tris, 1mM EDTA, 0,1% Triton X-100

### 3.1.4 Reagenti za PCR v realnem času

Preglednica 8: Seznam reagentov za merjenje izražanja genov z metodo PCR v realnem času. Kompleti so sestavljeni iz parov specifičnih začetnih oligonukleotidov in sonde.

Proizvod	Podjetje	Številka proizvoda
GAPD endogena kontrola	Applied Biosystems	4310884E
POU5F1	Applied Biosystems	4331182
Plošča s 96 vdolbinicami za reakcijo	Applied Biosystems	4306737
TaqMan® univerzalna PCR mešanica	Applied Biosystems	4304437
SOX2 komplet	Applied Biosystems	4331182
PAX6 komplet	Applied Biosystems	4331182
SOX17 komplet	Applied Biosystems	4331182
T, brachyury homolog komplet	Applied Biosystems	4331182
FOXA2 komplet	Applied Biosystems	4331182
CBFA1 komplet	Applied Biosystems	4331182
SOX9 komplet	Applied Biosystems	4331182
PPARG komplet	Applied Biosystems	4331182
AFP komplet	Applied Biosystems	4331182
NANOG (sonda)	Applied Biosystems	4316034
NANOG (začetni oligonukleotid; forward)	Applied Biosystems	4304970
NANOG (začetni oligonukleotid; reverse)	Applied Biosystems	4304970

### 3.1.5 Celice

#### 3.1.5.1 Humane matične celice

ASC smo dobili iz laboratorija prof. dr. Jeffreya M. Gimbla (Pennington Biomedical Research Center, Luisiana, ZDA). Prejeli smo izolirane zamrznjene ASC, ki so bile pridobljene iz maščobnega tkiva.

Embrionalne matične celice linije H13 so bile pridobljene iz inštituta WiCell (Wisconsin), številka: WA13 (H13.C)-DL-1 (Subclone C).

#### 3.1.5.2 Hranilna plast

Celice, uporabljeni za hranilno plast, smo kupili pri podjetju Chemicon. Gre za proizvod PMEF-CF, imenovan EmbryoMax. Celice so primarni mišji embrionalni fibroblasti sev CF1, tretirani z mitomicinom C, tretja pasaža.

## 3.2 METODE GOJENJA CELIC

### 3.2.1 Rast in menjava gojišča

Celice hASC smo na začetku nasadili z gostoto 5000 celic na  $\text{cm}^2$  na posodo  $75 \text{ cm}^2$  v 12 mL gojišča. Celice so rasle pritrjeno, tako da je bila menjava gojišča preprosta. Celice so prerasle površino gojilne posode v sedmih dneh, bilo pa jih je približno štirikrat več. Medij smo jim menjali vsake tri do štiri dni.

Celice hESC se niso pritrjale na dno gojilnih posod temveč so rasle na hranilni plasti mEF. Gojili smo jih v posodah s šestimi vdolbinicami. Celice smo prekrili s 3 mL gojišča.

#### Postopek menjave gojišča

Ne glede na posodo, v kateri smo gojili celice, je bil postopek menjave gojišča enak. Če so bile celice pritrjene, smo gojišče enostavno aspirirali, kadar pa so celice po vzorčenju prosto plavale v suspenziji, je bilo pred aspiracijo potrebno še centrifugiranje (hASC 250 G, hESC 114 G, 5 min). Nato smo celice hitro prelili s svežim gojiščem, saj celice niso smelete biti predolgo na suhem.

### 3.2.2 Presajevanje hASC

hASC smo gojili pritrjene na podlago gojilne posode. Celice smo običajno presadili v nove gojilne posode v manjši gostoti, ali pa smo jih uporabili v poskusih. Presajevanje smo delali v brezprašni komori, s čimer smo zagotovili sterilnost. Ker je tripsin, ki se uporablja pri presajevanju, proteinaza, lahko dolgotrajnejša izpostavitev poškoduje celice. Potrebno ga je torej čim prej inaktivirati s fetalnim govejim serumom (FBS), ter odstraniti iz gojilnega medija.

#### Postopek presajevanja za gojilno posodo velikosti $75 \text{ cm}^2$

1. Odstranitev gojišča: celicam v gojilni posodi smo aspirirali medij.
2. Spiranje: celice smo sprali z 10 mL DPBS brez Mg in Ca. S tem smo odstranili FBS (komponenta gojišča), ki bi inaktiviral tripsin (in s tem zmanjšal učinkovitost postopka) ter razrahljali izvencelični matriks.
3. Tripsinizacija: celice smo prekrili s 3 mL tripsina in inkubirali pri  $37^\circ\text{C}$  od 3 do 5 minut. Tripsin smo po inkubaciji inaktivirali z najmanj enakim volumnom gojišča DFB, torej najmanj 3 mL.
4. Resuspenzija: celice smo resuspendirali s 5 mL pipeto (celice smo pipetirali skozi pipeto od 7 do 15 krat), ter jih prenesli v novo epruveto. Hkrati smo vzeli tudi vzorec za štetje.
5. Centrifugiranje: epruveto smo nato centrifugirali (250 G, 5 min), med centrifugiranjem pa smo običajno prešeli celice in s tem določili, v kakšnih volumnih bomo celice resuspendirali naprej.
6. Resuspenzija v svežem gojišču: po centrifugiranju smo aspirirali gojišče (s tem smo dokončno odstranili tripsin), celice pa resuspendirali v ustrezнем volumnu medija in običajno nasadili v novo gojilno posodo. S tem korakom so celice prešle v novo pasažo, kar smo tudi označili na gojilni posodi ter v dnevniku.

### 3.2.3 Presajevanje hESC

Celice hESC smo gojili na ploščah s 6 vdolbinicami v 3 mL gojišča KODB in na hrnilni plasti mEF, na katere so bile hESC pritrjene. Ta stik smo razbili s tretiranjem s kolagenazo, po katerem smo dobili odlepljene kolonije hESC.

Kolonije smo nato po potrebi razbili na posamezne celice s tripsinom. Tripsinizacija hESC je pomembna za štetje, vzorčenje ter druge manipulacije, kjer so potrebne posamezne celice.

#### Postopek presajevanja

1. Odstranitev gojišča: Celicam smo aspirirali gojišče in jih spirali s 3 mL DPBS 20 s.
2. Odlepljanje od mEF: v vdolbinice smo po aspiraciji DPBS dodali 1 mL kolagenaze. Celice smo nato inkubirali 5 do 20 minut pri 37°C. Dalj časa, kot smo jih inkubirali, več fibroblastov se je odlepilo, vendar pa smo dobili tudi več kolonij hESC. S pipeto smo odlepljene kolonije zbrali v epruveto. Ker gojišče ne inaktivira kolagenaze, smo celice centrifugirali (114 G, 5 min), aspirirali supernatant in resuspendirali kolonije v svežem gojišču KODB.
3. Nasajevanje: kolonije smo nato nasadili v novo gojilno posodo v ustreznih začetnih nasaditvenih gostotih, navadno v razmerju 1:3 (iz ene presajene vdolbine na 3 nove vdolbine gojilne posode).

Kolonije se lahko razbije na posamezne celice. V tem primeru smo pelet resuspendirali v 1 mL tripsina ter inkubirali 2 minuti pri 37°C. Po inkubaciji smo tripsin inaktivirali v istem gojišču in celice resuspendirali z 1ml avtomatsko pipeto. Celice smo lahko v tej fazi prešteli, nato pa centrifugirali ter resuspendirali v svežem gojišču.

### 3.2.4 Zamrzovanje hASC

Zamrzovanje je potekalo v kriovialah, potopljenih v tekoči dušik. Standardno število celic na kriovialo je bilo med  $5 * 10^5$  in  $5 * 10^6$ . Zamrzovanje je potekalo počasi, do -80°C smo celice zamrzovali po 1°C na minuto. Na koncu smo celice potopili v tekoči dušik, kjer lahko ostanejo zmrznjene tudi več let pri -196°C.

#### Postopek zamrzovanja

1. Priprava raztopine za zamrzovanje: pripravili smo raztopino za zamrzovanje tako, da smo zmešali 80% raztopino FBS (ohljen) in 20% raztopino DMSO in jo nato sterilno filtrirali.
2. Trispinizacija: če smo delali s pritrjenimi celicami, jih je bilo potrebno trispinizirati. Ko so se odlepile od podlage, smo tripsin inaktivirali s FBS. Nato smo celice centrifugirali (250 G, 5 min) in resuspendirali v 2 mL gojišča DFB.
3. Dodajanje raztopine za zamrzovanje: raztopino za zamrzovanje smo nato zmešali s celično suspenzijo v razmerju 1:1 (končna koncentracija DMSO je bila 10%), raztopino za zamrzovanje smo dodajali po kapljicah, saj je DMSO toksičen za celice. Ob dodajanju smo suspenzijo mešali z roko.
4. Zamrzovanje pri -80°C: ko smo dodali celo raztopino, smo celice kar se da hitro prenesli v že prej pripravljene krioviale. Krioviale se nato naloži v posodico za

zamrzovanje, v kateri je izopropanol (ta omogoča, da zamrzovanje poteka 1°C na minuto), posodico pa smo hitro prenesli v zamrzovalnik na -80°C.

5. Zamrzovanje v tekočem dušiku: po 24 h smo kriovialo prenesli v posebno posodo, ki smo jo nato potopili v tekoči dušik. Kadarkoli smo zaprte viale potapljali v tekoči dušik, je obstajala nevarnost eksplozije vial zaradi temperaturnih sprememb. Ker je bil v vialah biološki material, smo morali biti posebno previdni, ter nositi zaščitna očala.

### 3.2.5 Odmrzovanje hASC

Kadar smo celice odmrzovali, smo morali delati hitro in si predhodno pripraviti reagente. DMSO je namreč toksičen za odtajajoče celice. Zaželeno je, da so celice čim manj časa izpostavljene DMSO, saj to izboljša njihovo preživetje.

Postopek odmrzovanja

1. Odpiranje vial: posodo s kriovialami smo previdno in počasi vzeli iz tekočega dušika. Iz nje smo vzeli želene krioviale, ki smo jim rahlo odvili pokrovček. Počakali smo, da je iz njih prenehal izhajati plin. Pokrovček smo ponovno zaprli, kriovialo pa potopili v kopel pri 37°C. Ko je bil ledeni kristalček v krioviali velikosti od 4 do 5 mm, smo kriovialo prenesli v brezprašno komoro.
2. Dodajanje svežega gojišča: vsebino krioviale smo prenesli v novo epruveto s 5 mL pipeto. Po kapljicah smo nato dodajali na 37°C segreto sveže gojišče, da smo razredčili toksični DMSO.
3. Centrifugiranje: celično suspenzijo smo centrifugirali (250 G, 5 min), odstranili supernatant ter pelet suspendirali v svežem gojišču.
4. Ponovna nasaditev in ocena živosti: celice smo nasadili v nove gojilne posode. Pred nasaditvijo smo vzeli majhen vzorec, v katerem smo prešteli celice. Rezultat smo primerjali z gostoto celic ob zamrzovanju in na ta način ocenili živost.

## 3.3 METODE KARAKTERIZACIJE CELIC

### 3.3.1 Merjenje metabolne aktivnosti s testom XTT

Metabolno aktivnost celic smo izmerili z XTT kitom, katerega glavna komponenta je natrijeva sol XTT (2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolijeva-5-karboksianilidna inertna sol).

Princip delovanja

Ko je molekula XTT vstopila v metabolno aktivno celico, so ji mitochondrijske dehidrogenaze cepile tetrazolijev obroč. Pri tem so nastali oranžni kristali formazana, ki so bili topni v vodni raztopini. Raztopini smo izmerili absorbanco pri 450 nm (ozadje pri 690 nm), ki je bila premo sorazmerna z metabolno aktivnostjo celic. V nekaterih primerih smo celice le pogledali pod fazno kontrastnim mikroskopom ter barvno slikali. Na podlagi primerjave barvnih slik smo lahko kvalitativno ocenili, katere celice so bile bolj metabolno aktivne.

#### Postopek testa

1. Priprava založne raztopine: eno vialo XTT, ki smo jo dobili v kompletu, smo segreli na sobno temperaturo, gojišče RPMI pa na 37°C. V vialo smo dodali 5 mL gojišča RPMI, ter v njem raztopili XTT. Za izvedbo testa smo naredili 20% raztopino v RPMI mediju, ki smo jo dodali celicam namesto medija, v katerem so celice rastle.
2. Inkubacija: celice smo inkubirali tri ure pri 37°C (v inkubatorju).
3. Merjenje absorbance: absorbanco smo izmerili s spektrofotometrom pri 450 nm od katere smo odšteli ozadje pri 690 nm.

#### 3.3.2 Ocena živosti s testom Live/Dead

Živost celic smo ocenjevali s kompletom Live/Dead (L/D), ki je sestavljen iz dveh komponent; komponenta A je Calcein AM, komponenta B je Ethidium homodimer-1.

#### Princip delovanja

V živih celicah so delovale znotrajcelične esteraze, ki so pretvorile permeabilni Calcein AM (skoraj brez fluorescence) v intenzivno fluorescentni Calcein (ekscitacija: 494 nm, emisija: 517 nm), ki pa je bil nepermeabilen in se je zaradi tega zadržal v celicah. Ethidium homodimer-1 je lahko prehajal le poškodovane celične membrane. Znotraj poškodovanih celic se je vezal na nukleinske kisline, s čimer se mu je povečala fluorescenca za 40x (ekscitacija: 528 nm, emisija: 617 nm). Žive celice so se zaradi tega obarvale zeleno, mrtve oz. poškodovane pa rdeče.

#### Postopek testa

1. Priprava založne raztopine: pripravili smo raztopino DPBS pri 37°C s končno koncentracijo komponente A 0,5 µL/mL in komponente B 2 µL/mL.
2. Inkubacija: celice smo prekrili z založno raztopino in jih inkubirali 20 min pri sobni temperaturi.
3. Pregled celic pod fazno kontrastnim ter fluorescentnim mikroskopom: žive celice so se obarvale zeleno, mrtve pa rdeče. Z digitalno kamero Hamamatsu smo posneli črno-bele slike (program Metamorph).
4. Računalniška obdelava slik: slike smo obdelali s programom Image J 1.41 (National Institutes of Health, ZDA). Slikam smo digitalno odstrani ozadje, ter posamezne signale obarvali (žive celice – zelene, mrtve celice – rdeče) ter slike digitalno združili v eno. Tako smo na eni sliki videli, koliko celic je bilo živih in koliko mrtvih.

#### 3.3.3 Štetje celic s števno komoro

Števna komora je bila sestavljena iz dveh delov, v katerih je bilo po 9 kvadratnih vdolbin (skupno 18). Ena kvadratna vdolbina je merila 0,1 µL. Celično suspenzijo je bilo včasih potrebno tudi razredčiti, da ni bila pregosta. Štetje je bilo najbolj natančno, kadar smo prešteli 10 celic na kvadratno vdolbino. Pri vzorčenju in tudi tekom celotnega postopka smo celično suspenzijo mešali na mešalu, saj se je le tako ohranjala enakomerna porazdelitev celic v suspenziji, ki je pogoj za dobro vzorčenje.

#### Princip delovanja tripanskega modrila

Molekule tripana so zaradi svojih kemičnih lastnosti lahko prehajale le membrane mrtvih celic, membrane živih celic pa za njih ostanejo neprehodne. Tako so se pod mikroskopom

žive celice videle kot svetle, bele pike, mrtve pa kot razločno modre. S tripan modrim smo tako prešteli celice v vzorcu, hkrati pa tudi videli, koliko jih je živih ter koliko mrtvih.

#### Postopek štetja celic

1. Priprava števne komore: iz števne komore smo najprej obrisali morebitne umazanije in jo pokrili s krovnim stekлом.
2. Vzorčenje: v 0,5 mL mikrocentrifugirko smo dodali 20  $\mu\text{L}$  vzorca celične suspenzije, ki smo ga ustrezno redčili in premešali tik pred jemanjem. Dodali smo 20  $\mu\text{L}$  tripana ter suspenzijo ponovno premešali. Vzorec smo s pipeto nanesli na zarezo na robu števne komore, ter pustili, da je kapilarni vlek povlekel suspenzijo pod krovno steklo.
3. Štetje: na svetlobnem mikroskopu smo nato prešteli celice v vseh 18 vdolbinah.
4. Izračun: izračunalni smo povprečno število celic na polje, ki smo ga nato množili s  $10000 \text{ mL}^{-1}$ . Upoštevali smo tudi dvakratno redčitev zaradi mešanja s tripanom, ter morebitne predhodne redčitve. Rezultat smo torej množili še z 2x in tako upoštevali redčitev vzorca s tripanom. Končni rezultat je bila gostota celic v začetni suspenziji (število celic na mL).

#### 3.3.4 Določanje števila celic z merjenjem DNA

Klasične metode določanja števila celic temeljijo na direktnem štetju celic, ali pa na različnih ocenah celičnih komponent (vsebnost DNA, vsebnost proteinov) ali aktivnosti (metabolna aktivnost). Kadar direktno štetje ni bilo mogoče (npr. po enkapsulaciji celic v kolagenski gel) smo za oceno števila celic uporabili tehniko merjenja DNA v celotni kolagenski kapljici. Na podlagi informacije o količini DNA v celici in na podlagi umeritvene krivulje (ocena vsebnosti DNA v eni celici) smo lahko ocenili, koliko celic se nahaja v kolagenski kapljici.

#### Princip delovanja

Celice smo skupaj s kolagenskim nosilcem izpostavili proteinazi K. S tem se je iz njih sprostila DNA, katere koncentracijo smo izmerili.

Koncentracijo DNA smo izmerili z reagentom Quant-iT PicoGreen kitom. Reagent je deloval na principu fluorescence. Ob vezavi na dvojno vijačnico DNA je pričel fluorescirati (ekscitacija/emisija 502/523 nm), kar smo zaznali s čitalcem fluorescence. Vezava je bila zelo specifična, zaradi česar nam ni bilo potrebno DNA ločiti od RNA, proteinov in ostalih ostankov celic. Za določanje koncentracije smo uporabili umeritveno krivuljo iz standardne raztopine DNA. Vsako koncentracijo smo nanesli trikrat zaradi večje natančnosti meritev in kasnejših izračunov. Zaradi občutljivosti reagenta na svetlobo smo test delali v zatemnjem prostoru.

#### Postopek merjenja DNA

1. Zbiranje vzorca: vzorec DNA smo iz gojilne posode zbrali v mikrocentrifugirko, nato pa smo celotno gojilno posodico sprali z 0,5 mL TEX pufra, ter ga dodali v isto mikrocentrifugirko.
2. Razgradnja celic: dodali smo proteinazo K v končni koncentraciji 0,1 mg/mL. Vzorce smo inkubirali pri temperaturi 50°C 16 ur (čez noč).
3. Redčitve: pripravili smo standarde v koncentracijah 0, 50, 200, 500, 700 in 1000 ng/mL, vsakega v treh ponovitvah po 100  $\mu\text{L}$ . Vzorce DNA smo pripravili v enakem

volumnu, lahko pa v različnih redčitvah, če ranga koncentracije DNA ni bilo mogoče predvideti.

4. Priprava raztopin za merjenje: uporabili smo črno ploščo (posebej prilagojena za meritve fluorescence) s 96 vdolbinicami, v katere smo dodali po 100 µL vzorcev. Pripravili smo delovno raztopino, kjer smo na 199 volumskih enot TE pufra dodali 1 volumska enota fluorescentnega reagenta PicoGreen. Z multikanalno avtomatsko pipeto smo dodali po 100 µL delavne raztopine k vsakemu od vzorcev DNA.
5. Merjenje fluorescence: fluorescenco smo izmerili na čitalcu fluorescence. Število celic smo določili na podlagi umeritvene krivulje, ki smo jo naredili z merjenjem DNA v gelih z znanim številom celic (določenim z direktnim štetjem).

### 3.3.5 Izolacija RNA

RNA smo izolirali z reagentom TRIzol po protokolu, ki ga priporoča proizvajalec. Reagent je enofazna raztopina fenola in gvandin izotiocianata, ki omogoča izolacijo RNA na preprost način. Ker smo v tej diplomski nalogi RNA uporabljali samo za PCR v realnem času (analiza transkripcije), je pomembno, da se ohranja čisto in nerazgrajeno RNA. Zaradi tega je pomembno, da so vsi reagenti in laboratorijska oprema (tipsi za pipete, delavní pult in epruvete) čisti. To pomeni, da v njih ne sme biti drugih organizmov ali nukleinskih kislin, prav tako ne encimov RNaz in DNaz, ki bi lahko razgradili RNA v vzorcu.

#### Princip delovanja TRIzol reagenta

Princip delovanja temelji na razgradnji celic ter kasnejši fazni separaciji. Protokol izkorišča kemijske in fizikalne lastnosti molekule RNA, da jo loči od ostalih v suspenziji.

#### Postopek izolacije RNA

1. Centrifugiranje: celice smo najprej centrifugirali pri 250 G 5 minut.
2. Homogenizacija: celicam smo dodali 1 mL reagenta TRIzol, in jih homogenizirali. Homogenizacijo smo naredili s pipetiranjem skozi 1 mL pipeto toliko časa, dokler v suspenziji ni bilo več videti delčkov s prostim očesom (od 30 do 50 krat). Vzorce smo inkubirali na sobni temperaturi pet minut, ter s tem popolnoma ločili kompleks RNA - proteini.
3. Kloroform: dodali smo 100 µL kloroforma in dobro zatesnili mikrocentrifugirke. Vzorce smo močno mešali 15 sekund na mešalu, ter inkubirali na sobni temperaturi 2 do 3 minute.
4. Ločba na dve fazi: vzorec smo centrifugirali (12.000 G, 15 min, 2°C). Po centrifugiranju se je suspenzija porazdelila v dve fazi, v spodnjo fenol-kloroform fazo ter v zgornjo vodno fazo, kjer se je nahajala RNA. Previdno smo odpipetirali vodno fazo iz suspenzije ter jo prenesli v novo mikrocentrifugirko.
5. Obarjanje: k novi suspenziji smo dodali 250 µL izopropil alkohola (izopropanol) ter vzorce inkubirali pri sobni temperaturi. RNA se je oborila. Vzorce smo centrifugirali (112.000 G, 10 min, 2°C). Po centrifugiranju smo pogosto na dnu mikrocentrifugirke videli majhno RNA oborino. Supernatant smo nato previdno odstranili.
6. Spiranje: RNA smo sprali s 75% etanolom, ki smo ga dodali 0,5 mL k vsakemu vzorcu. Vzorce smo premešali in ponovno centrifugirali (7.500 G, 5 min, 2°C). Previdno smo odstranili supernatant. Etanol bi lahko motil vse nadaljnje postopke pri analizi RNA, zato je bilo pomembno, da smo ga odstranili čim več. Ker se vsega ni dalo odstraniti s

pipeto, smo vzorce pustili v odprtih mikrocentrifugirkah v brezprašni komori (30-60 min), da je odvečni etanol izhlapel.

7. Resuspenzija: dodali smo 30  $\mu\text{L}$  čiste vode, v kateri smo RNA resuspendirali z mešanjem. Vzorce, ki jih nismo takoj potrebovali, smo shranili na -80°C.

### 3.3.6 Merjenje koncentracije RNA

Kot že omenjeno, smo v tem diplomskem delu RNA izolirali izključno za analizo izražanja genov z metodo PCR v realnem času, pred katero pa je bilo potrebno RNA prepisati v cDNA. Ker so nadaljnji postopki dolgotrajni in dragi, je priporočljivo izvedeti, če izolacija RNA pri kakšnem vzorcu ni uspela, ali pa so bile celice že na začetku premalo žive, da bi imele dovolj RNA za analizo. Koncentracijo RNA smo izmerili po protokolu Quant-iT RNA kompleta z napravo za merjenje fluorescence fluorimeter Qubit.

Princip delovanja fluorescence

Quant-iT RNA reagent reagira z RNA bistveno bolj kot z DNA. Rezultat reakcije je fluorescensa reagenta (ekscitacija/emisija 644/673 nm), ki smo jo izmerili s čitalcem fluorescence Qubit fluorimeter. Zaradi občutljivosti reagenta na svetlobo smo meritve izvajali v zatemnjenem prostoru.

Postopek merjenja RNA

1. Priprava raztopin za merjenje: pripravili smo delavno raztopino, ki jo je sestavljala 1 volumska enota Quant-iT RNA reagenta ter 199 volumskih enot TE pufra. V posebne priložene mikrocentrifugirke, ki dobro prepuščajo svetlobo, smo dali od 180 do 199  $\mu\text{L}$  delavne raztopine, nato pa vzorec do končnega volumna 200  $\mu\text{L}$ .
2. Merjenje: ob jemanju vzorca in tudi pred merjenjem smo raztopino premešali, da je bila meritev kar se da natančna. Pred merjenjem smo Qubit fluorimeter umerili s priloženima standardoma RNA.

### 3.3.7 Metoda reverzne transkripcije in PCR (RT-PCR)

RNA je nestabilna, enoverižna in tvori sekundarne strukture. Zato ni primerna za neposredno analizo izražanja genov in se jo prepiše v komplementarno DNA (cDNA).

Princip prepisovanja mRNA v cDNA

Princip temelji na virusnem encimu reverzna transkriptaza (RT). Ta prepiše RNA v komplementarno DNA (cDNA), s katero so mogoče nadaljnje manipulacije. Prepisovanje poteka cikličnem termostatu za PCR. Uporabili smo RT-PCR komplet.

Postopek prepisovanja

1. Priprava vzorcev: uporabili smo vzorce izolirane RNA, ki pa smo jih najprej premešali in kratko centrifugirali, da smo dobili homogeno raztopino RNA.
2. Priprava delavne raztopine: v mikrocentrifugirko za PCR smo dodali 8  $\mu\text{L}$  izolirane RNA, 1  $\mu\text{L}$  naključnih heksamerov v koncentraciji 50 ng/ $\mu\text{L}$  (priloženi v kitu), ter 1  $\mu\text{L}$  dNTP mešanice v koncentraciji 10 mM.
3. Sekundarne strukture: vsak vzorec smo inkubirali pri 65°C 5 min, da smo podrli sekundarne strukture, nato pa smo vzorce dali na led za najmanj 1 min.

4. Priprava mešanice za sintezo cDNA: pripravili smo si mešanico, ki je vsebovala naslednje komponente (priložene v kitu):
  - RT-PCR pufer, 10x koncentriran 2 µL/vzorec
  - MgCl<sub>2</sub>, 25mM, 4 µL/vzorec
  - DTT, 0,1 M, 2 µL/vzorec
  - RNaseOUT [TM], 40 U/µL, 1 µL/vzorec
  - SuperScript [TM] III RT, 200 U/µL, 1 µL/vzorec.
5. Mešanico smo dodali k vzorcem po 10 µL na vzorec, previdno premešali in rahlo centrifugirali.
6. Inkubacija: vzorce smo inkubirali pri 25°C, 10 min, nato pri 50°C, 50 min. Reakcijo smo ustavili z inkubacijo pri 85°C, 5 min. Vzorce smo nato ohladili na ledu.
7. Razgradnja RNA: vzorce smo rahlo centrifugirali, da smo pobrali vse kapljice po stenah mikrocentrifugirke. Nato smo k vsakemu vzorcu dodali 1 µL RNase H (priložena kompletu), ter inkubirali pri 37°C, 20 min. Po inkubaciji so bili vzorci pripravljeni za nadaljnjo manipulacijo, lahko pa smo jih zmrznili pri -20°C.

### 3.3.8 Določanje aktivnosti genov z metodo PCR v realnem času

Za določanje aktivnosti genov, smo morali najprej izolirati mRNA, jo prepisati v cDNA in nato cDNA pomnožiti z metodo PCR v realnem času (qPCR). Za analizo izražanja genov je potrebno poznati tarčno sekvenco mRNA (na kateri temelji konstrukcija začetnih oligonukleotidov), oz. izbrati izmed naprej pripravljenih kompletov, ki omogočajo detekcijo in kvantifikacijo izražanja genov.

#### Princip metode Real Time PCR

Metoda temelji na PCR, le da smo dodali še posebna DNA sondo, specifično za točno določen gen, ki je ob vsaki pomnožitvi tarčnega fragmenta razgrajena in tako odda fluorescentni signal. Ciklični termostat za PCR v realnem času ima senzor, ki neprestano spremlja fluorescenco. Več, kot je bilo specifične RNA v začetnem vzorcu, več je bilo cDNA, več pomnožitev cDNA in zato tudi večja fluorescensa pri določenem ciklu reakcije. Ob vsaki qPCR reakciji smo pomnoževali tudi DNA od gena, za katerega je znano, da se vedno izraža (hišni gen). Merili smo, v katerem ciklu doseže reakcija z določenim genom računalniško določeno pravno fluorescenco. Ker vsak cikel podvoji koncentracijo DNA, smo lahko na podlagi razlike v številu ciklov za doseg praga zaznavne fluorescence izračunali, kolikokrat je bil določen gen izražen v primerjavi s hišnim genom (normalizacija) in nato primerjali vzorce med seboj.

#### Postopek določanja aktivnosti genov

1. Priprava cDNA: raztopino cDNA smo z vodo brez DNaz in RNaz redčili 2x (do 42 µL) in 2 µL uporabili za pomnožitev specifičnih produktov s PCR v realnem času.
2. Priprava reakcijskih mešanic: v ploščice s 96 luknjami smo za tarčne gene CBFA1, Sox9, PPRG, Oct4, Sox2, Brachyury, Sox17, Pax 6 ter za hišni gen GAPD pripravili sledeče reakcijske mešanice (končni volumen reakcije 25 µL):
  - TaqMan®Universal PCR Master Mix 12,5 µL
  - Komplet za specifični gen (oligonukleotidne začetnike in sondi) 1,25 µL
  - Voda brez DNaz in RNaz 9,25 µL
  - Vzorec razredčene cDNA 2 µL

3. Pomnoževanje: ploščice smo zaprli s samolepljivo prosojno folijo in cDNA pomnoževali v cikličnem termostatu za qPCR po naslednjem programu:
  - začetna denaturacija vzorca (1 cikel):
    - 50°C; 2 min
    - 95°C; 10 min
  - pomnoževanje (50 ciklov):
    - 95°C; 15 s – denaturacija.
    - 60°C; 1 min - prileganje začetnih oligonukleotidov, pomnoževanje
4. Analiza rezultatov: rezultate smo analizirali s programom SDS 2.1 (Applied Biosystems), pri čemer smo za nastavitev osnovnih vrednosti (»baseline«) ter mejnih vrednosti fluorescence (»threshold«) upoštevali napotke proizvajalca. Izražanje tarčnih genov smo normalizirali na izražanje hišnega gena GAPD, in jih predstavili kot relativne vrednosti za vsak eksperiment ter tip celic.

### 3.4 GOJENJE MATIČNIH CELIC V 3D OKOLJU

#### 3.4.1 Celice v mikromasah

hASC smo gojili v mikromasah (MM) za primerjavo ostalim poskusom, ko smo celice gojili ujete v kolagen in HA. Na ploščo z 12 vdolbinicami smo nanesli kapljice gojišča, v katerem so bile suspendirane celice. Tako smo omogočili visoko gostoto nasaditve in vzpostavitev medceličnih stikov. Celotno okolje izvenceličnega matriksa so celice sintetizirale same.

Postopek priprave celic v MM

1. Formacija kapljic: s pipeto smo v vsako vdolbinico na plošči z 12 vdolbinicami nakapljali po eno 25 µL kapljico. Kapljice so vsebovale 25.000 in 100.000 celic.
2. Inkubacija: kapljice smo inkubirali 30 minut pri 37°C. V tem času so se celice pritrstile na podlago plošče.
3. Gojenje: po inkubaciji smo jim dodali 1 mL DF gojišča na vdolbinico. Celice smo še naprej gojili pri 37°C in jim gojišče menjavali na 3 do 4 dni.

#### 3.4.2 Celice v peletih

Peleti celic so podobno kot mikromase ponazarjali osnovno 3D okolje, ki ga lahko celice ustvarijo, le da gre za suspenzijsko kulturo skupka celic (brez pritrditve na gojilno posodo). Celotno okolje, ki je obdajalo posamezne celice ter tudi vse medcelične stike, so ustvarile celice same. Analiza takih vzorcev nam je služila kot primerjava z drugimi 3D okolji, saj je eden od signalov za diferenciacijo tesen medcelični stik.

Postopek priprave celic v peletih

1. Priprava celične suspenzije: v mediju, ki smo ga uporabili tudi za nadaljnje gojenje, smo pripravili ustrezno gostoto celic. hASC je bilo 250.000, hESC pa 500.000 na pelet.
2. Centrifugiranje: celice smo centrifugirali 5 minut pri različnih hitrostih. Hitrosti so bile vse od 100 G do 1000 G, nekaterih celic pa nismo centrifugirali, temveč smo pustili, da se posedejo same od sebe.

3. Gjenje: celice smo gojili v mikrocentrifugirkah z V dnom, v vsaki je bil en pelet. Vsakemu peletu smo dodali 1 mL gojišča (DF za hASC in KOD za hESC) in ga menjali vsake 3 do 4 dni.

### 3.4.3 Celice v EB

Če smo hESC pustili v manjših skupkih suspendirane v gojišču v neadherentni petrijevki, se niso pritrstile na površino, temveč so v suspenziji tvorile embrioidna telesca (EB). EB so predstavljala celice v prvih fazah diferenciacije v zarodku. Služila so kot primerjava s celicami, ki smo jih enkapsulirali v nosilce. EB so manj homogena kot kulture peletov, celice v njih pa imajo ohranjene medcelične stike, ki so prisotni v predhodni fazi nediferencirane rasti v kolonijah.

#### Postopek priprave EB

1. Ločba: celice smo po odlepljanju od mEF s kolagenazo 15x resuspendirali z 10 mL pipeto, nato pa še 20x s 5 mL pipeto. Po potrebi smo jih spustili skozi 100 um sito, da smo ločili manjše skupke celic od večjih.
2. Odstranitev ostalih mEF: v suspenziji so skupaj z hESC prišle še nekatere mEF celice. Suspenzijo smo zato nanesli v  $75\text{ cm}^2$  gojilno posodo ter inkubirali za 1 h. V tem času so se mEF celice prijele na dno posode, hESC pa so bile še vedno v suspenziji.
3. Gjenje: celice smo po inkubaciji za odstranitev mEF nanesli na neadherentne petrijevke v gostoti 500.000 celic na mL. Celice so bile suspendirane v 5 mL medija na petrijevko v mediju KOD. Medij smo jim menjali na 3 do 4 dni s predhodnim centrifugiranjem (114G).

### 3.4.4 Celice v kolagenu

Celice smo v kolagenu gojili v obliki kolagenskih kapljic, v katerih so bile celice suspendirane. Kapljice smo naredili na ploščah z 12 vdolbinicami, v vsaki vdolbinici po eno kapljico. Gjili smo tako hASC kot hESC v različnih gostotah. Uporabljali smo različna gojišča. Celice smo tudi nasajevali posamezno ter v različno velikih skupkih.

#### Postopek priprave celic v kolagenu

1. a) Priprava hASC: celice smo po tripsinizaciji prešteli in ustrezno število celic zbrali v epruveti. Uporabili smo 20.000 in 100.000 celic na kapljico.  
b) Priprava hESC: celice smo najprej obdelali s kolagenazo 20 minut. Nato smo celice resuspendirali 15x z 10 mL pipeto.
  - Če smo želeli posamezne celice (PC), smo jih inkubirali s tripsinom 3 minute, ter nato tripsin inaktivirali z gojiščem. Nato smo celično suspenzijo spustili skozi 40 um sito, da smo se znebili večjih celičnih skupkov.
  - Če smo želeli celične skupke (CS), smo celice še dodatno resuspendirali (20x) s stekleno 5 mL pipeto. Celice smo spustili skozi 100 um sito, da smo se znebili večjih celičnih skupkov. Kadar smo se želeli znebiti tudi posameznih celic, smo suspenzijo spustili še skozi 40 um sito, ter pobrali le skupke, ki so ostali na situ.
2. Tako suspenzijo posameznih celic kot skupkov smo nanesli v gojilno posodo, ter jih inkubirali 1 h pri  $37^\circ\text{C}$ . S tem smo se znebili mEF celic, ki so še ostali v suspenziji, saj so se ti prilepili na podlago.

3. Priprava kolagena: za pripravo 1 mL kolagenske raztopine, primerne za inkubacijo celic, smo potrebovali PBS 10x koncentriran 100 µL, NaOH 1N 17,7 µL, H<sub>2</sub>O 111,1 µL ter kolagen 3,89 mg/mL 771,2 µL.
4. Kapljice: v mikrocentrifugirko smo odpipetirali ustrezeno število celic, ter jih centrifugirali (hASC 300 G, hESC 100 G) 5 minut. Uporabljali smo 200.000 in 500.000 celic na kapljico. Dodali smo ustrezen volumen pripravljene kolagenske suspenzije. Previdno smo premešali s pipeto, da smo homogeno razporedili celice. S to suspenzijo smo nato delali 25 µL kapljice na ploščo z 12 vdolbinicami. Ploščo smo po tem inkubirali pri 37°C, 30 min, da je kolagen polimeriziral.
5. Gojenje: v vsako luknjico smo nato dodali 1 mL gojišča. Celice smo gojili v inkubatorju na 37°C ter jim menjali gojišče na 3 do 4 dni.

#### **3.4.5 Celice v HA**

Celice smo v HA gojili v obliki kapljic primerljivo kapljicam kolagena. Metakrilatna hialuronska kislina je polimer, ki ima na vsaki ponavljajoči enoti prisotno reaktivno vinilno skupino. Ob prisotnosti fotoiniciatorja in UV svetlobe nastajajo radikali, ki se prenašajo prek vinilnih skupin in s tem tvorijo preplet med posameznimi molekulami polimera. Ob dovolj dolgi izpostavitvi UV svetlobi ta polimer tvori hidrogel (Burdic in sod., 2005). V ta namen smo sestavili škatlo z UV žarnicami, ki smo jo lahko spravili v brezprašno komoro. Celične suspenzije v HA raztopini smo nato nakapljali na ploščo z 12 vdolbinicami ter jih izpostavili UV svetlobi.

##### **Postopek priprave celic v HA**

1. Priprava celic: ta korak je enak kot koraka 1.a in 1.b pri kolagenu.
2. Priprava raztopine HA: najprej smo naredili 2% raztopino HA v PBS. Nato smo naredili 5% raztopino fotoiniciatorja v 70% etanolu (fotoiniciator je slabo topen v vodi). V PBS smo dodali raztopino fotoiniciatorja do končne koncentracije 0,1%.
3. Kapljice: v mikrocentrifugirko smo odpipetirali ustrezeno število celic, ter jih centrifugirali (hASC 300 G, hESC 100 G) 5 minut. Uporabljali smo 200.000 in 500.000 celic na kapljico. Dodali smo ustrezen volumen pripravljene kolagenske suspenzije. Previdno smo premešali s pipeto, da smo homogeno razporedili celice. S to suspenzijo smo nato delali 25 µL kapljice na ploščo z 12 vdolbinicami. Ploščo smo po tem inkubirali 10 minut na UV svetlobi, na razdalji 2 cm od žarnic. Po inkubaciji smo kapljice sprali s PBS (5x), ker je fotoiniciator toksičen za celice.
4. Gojenje: v vsako luknjico smo nato dodali 1 mL gojišča. Celice smo gojili v inkubatorju na 37°C ter jim menjali gojišče na 3 do 4 dni.

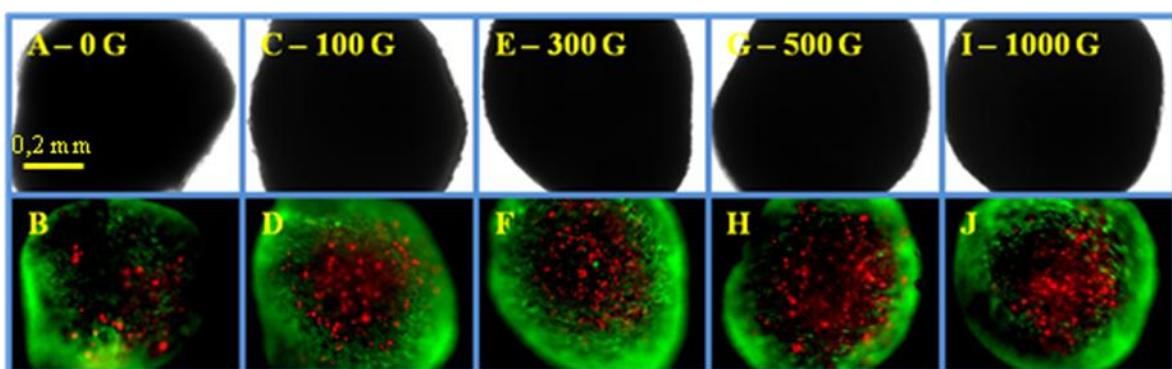
## 4 REZULTATI

### 4.1 RAST IN DIFERENCICIJA HASC

#### 4.1.1 Celice v peletih

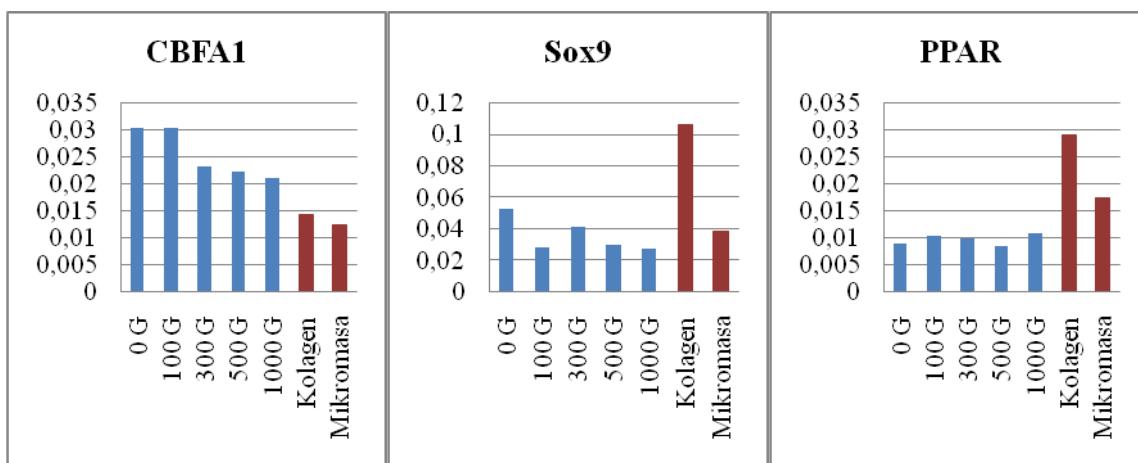
hASC smo gojili v peletih, ki smo jih pripravili s predhodnim centrifugiranjem 250.000 celic pri različnih hitrostih (0 G, 100 G, 300 G, 500 G, 1000 G) in jih inkubirali v gojišču DF. Po sedmih dneh gojenja smo analizirali živost celic v peletih s testom Live/Dead (L/D) ter analizirali izražanje genov CBFA1, Sox9 in PPAR z metodo qPCR. Izražanje smo primerjali tudi z izražanjem v celicah, ki smo jih gojili v kolagenu in v mikromasi v kasnejših poskusih (ne paralelno), prav tako po sedmih dneh.

Ugotovili smo, da so peleti ne glede na različno hitrost centrifugiranja približno enako veliki in razmeroma homogene, sferične oblike v vseh skupinah. Analiza živosti je pokazala, da so žive celice (obarvane zeleno, slika 3) razporejene večinoma v zunanjem delu peleta, celice v notranjosti peleta pa so pretežno mrtve (obarvane rdeče). Predvidevamo, da je dostop hranil v notranjost peleta omejen s hitrostjo difuzije, zato celice dobijo manj hranil in teže preživijo pri visoki celični gostoti.



Slika 3: Gojenje hASC v skupkih, ki smo jih centrifugirali z različnimi hitrostmi (A, B = 0 G; C, D = 100 G; E, F = 300 G; G, H = 500 G; I, J = 1000 G). Zgornja vrsta so peleti celic, posneti v svetlem polju (BF), spodnja vrsta pa isti peleti z uporabo fluorescence. Zeleno so barvane žive celice, rdeče pa mrtve.

Analize izražanja genov so pokazale primerljive ravni izražanja genov CBFA1, Sox9 in PPAR (transkripcijskih faktorjev, značilnih za osteogenezo, hondogenezo in adipogenezo, preglednica 4) med različnimi peleti, saj so bile razlike med skupinami manj kot 2-kratne. V primerjavi s celicami v peletih smo opazili nekoliko nižje ravni izražanja CBFA1 v kolagenu in mikromasi. Ravni Sox9 in PPAR so bili primerljivi med peleti in mikromaso ter 2.5-3x višji v kolagenu v primerjavi z mikromaso (slika 4).

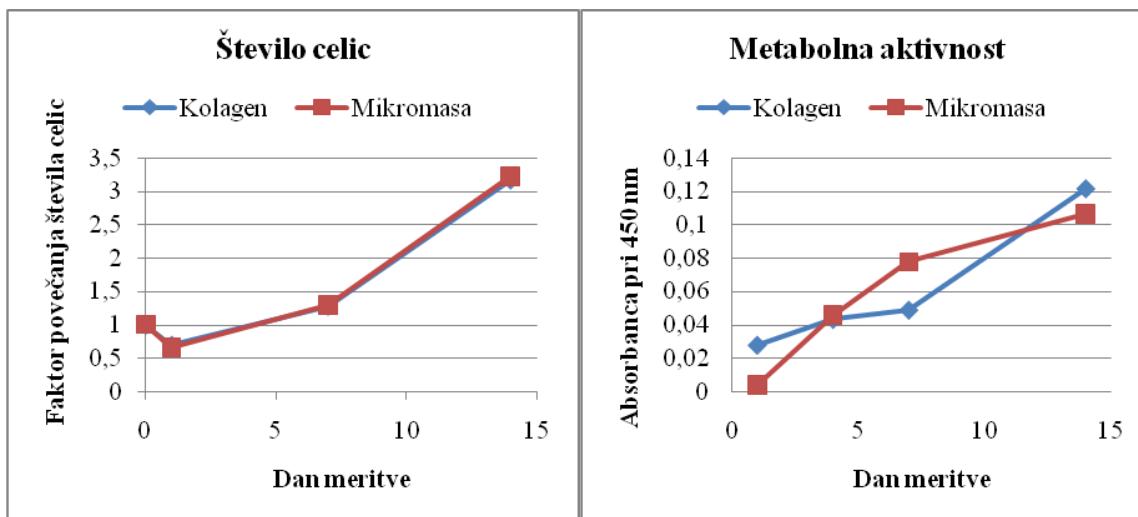


Slika 4: Izražanje genov glede na GAPD hišni gen. Modri stolpci predstavljajo celice, gojene v peletih (različne hitrosti centrifugiranja). Rdeči stolpci predstavljajo kontrolni skupini, v katerih so bile celice, gojene v kolagenu in mikromasi.

#### 4.1.2 Celice v kolagenu

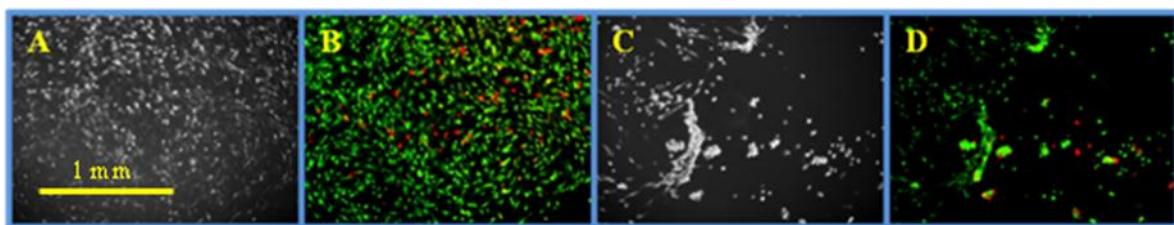
Celice smo gojili v kolagenu v gojišču DF, in jih primerjali z rastjo enakega števila celic v mikromasi (kontrolna skupina). Metabolno aktivnost celic smo spremljali s testom XTT (dan 1, 4, 7, 14), število celic pa smo ocenili z merjenjem koncentracije DNA. Četrti dan gojenja smo pregledali živost celic s testom L/D. Ob različnih dnevih (1, 4, 7, 14) smo pregledali tudi izražanje genov CBFA1, Sox9 in PPAR z metodo qPCR.

Ugotovili smo, da je metabolna aktivnost celic tako v kolagenskem gelu kot v mikromasah naraščala tekom 14 dni gojenja, in se povečala iz začetne vrednosti za približno petkrat. Podobno smo z merjenjem koncentracije DNA ocenili, da je skupno število celic narastlo več kot trikrat, podobno v obeh sistemih gojenja (slika 5). Razvidno je, da tako število celic kot njihova metabolna aktivnost naraščajo približno z enakim trendom v kolagenu in mikromasi.



Slika 5: Število celic (merjenje DNA) in njihova metabolna aktivnost (reakcija z XTT) med 14 dnevnim gojenjem v kolagenu in mikromasi.

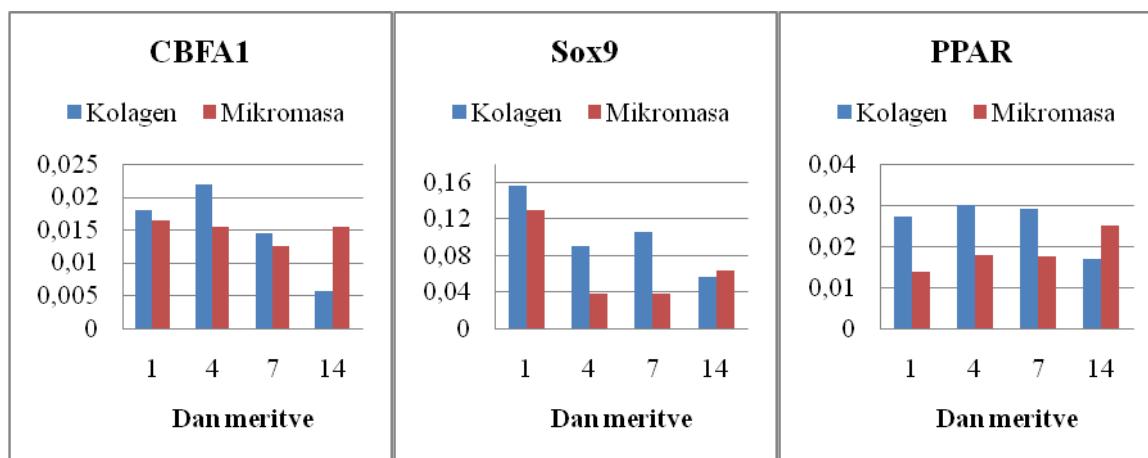
Opazili smo večjo homogenost razporeditve celic v kolagenu, živost pa je bila približno enaka v kolagenu in v mikromasi.



Slika 6: Živost celic četrti dan. A in B sta sliki celic v kolagenu, C in D sta sliki celic v mikromasi. Sliki A in C sta posneti v BF, sliki B in D pa z uporabo fluorescence. Celice, obarvane zeleno, so žive, celice, obarvane rdeče, so mrtve.

Analiza izražanja genov je pokazala razlike v vzorcih izražanja med posameznimi geni, kot tudi med obema tipoma kultur. Raven izražanja gena CBFA1 je bila primerljiva v kolagenu in mikromasi prvih 7 dni gojenja, nato pa je v kolagenu upadla približno 3x. Raven izražanja gena Sox9 je bila primerljiva le na začetku gojenja (dan1), nato pa je hitreje upadla v mikromasi kot v kolagenu. Raven izražanja gena PPAR je bila nekoliko višja v kolagenu kot v mikromasi prvih 7 dni gojenja, na dan 14 pa sta bili ravni izražanja primerljivi v obeh sistemih (slika 7).

Opazno je povečano izražanje genov Sox9 in PPAR v celicah v kolagenu v prvih sedmih dneh, nato pa začne izražanje vseh treh genov upadati. V celicah v mikromasi sta gena CBFA1 in PPAR večinoma izražena nespremenjeno, izražanje gena Sox9 pa se manjša s časom.

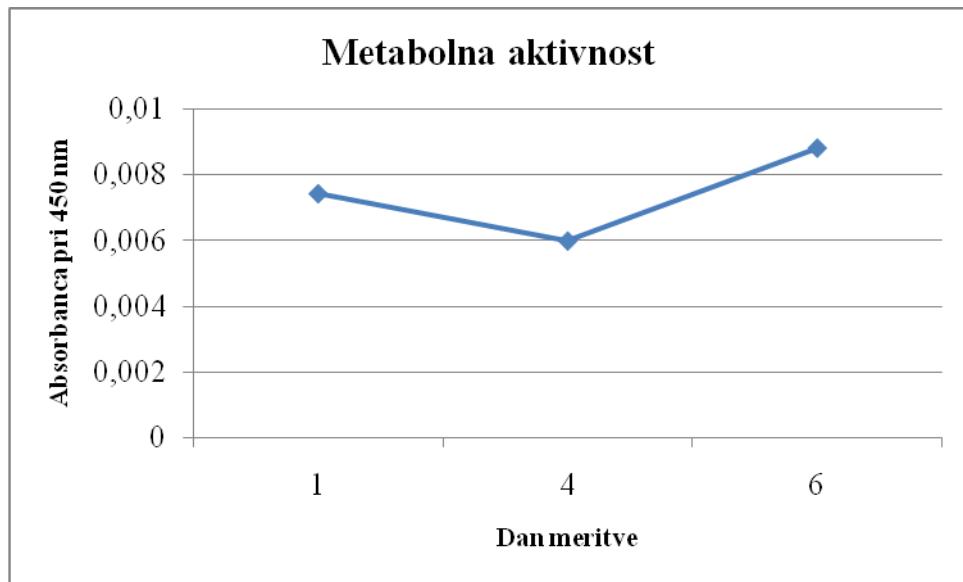


Slika 7: Izražanje genov glede na GAPDH hišni gen. Modri stolpci predstavljajo celice, gojene v kolagenu, rdeči stolpci pa celice, gojene v mikromasi.

#### 4.1.3 Celice v HA

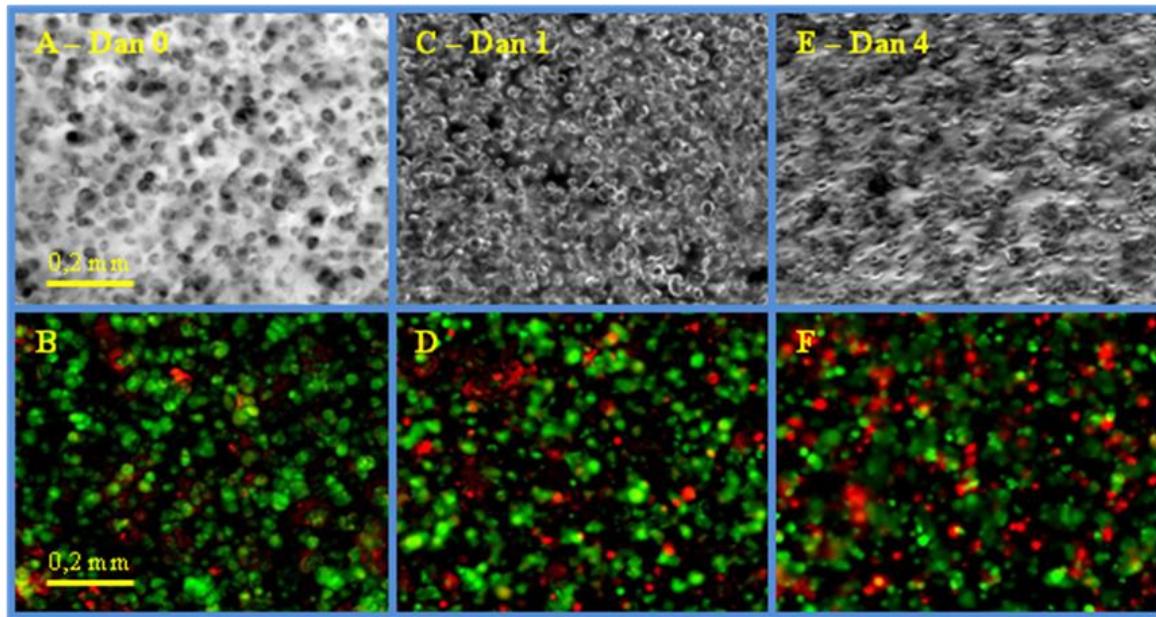
S celicami hASC smo začeli ugotavljati, kakšen je vpliv enkapsulacije in gojenja v HA na rast in preživetje. Zato smo celicam, ki smo jih gojili v HA do 6 dni (gojišče DF), merili metabolno aktivnost s testom XTT (dan 1, 4, 6), ter spremljali njihovo živost. Ugotovili

smo, da se je po enkapsulaciji metabolna aktivnost do dneva 4 znižala (Slika 8), kar se je ujemalo z rezultati testa L/D (slika 9), kjer je narastlo število mrtvih celic. Med denvi 4 in 6 je začela metabolna aktivnost rahlo naraščati. Kljub temu je v primerjavi s celicam v kolagenu in mikromasi metabolna aktivnost enakega števila celic v HA bistveno nižja (slika 5 in 8).



Slika 8: Metabolna aktivnost celic, gojenih v HA.

Živost hASC v HA smo preverjali s testom L/D (dan 0, 1, 4). Opazili smo, da so celice začele gel preraščati, vendar pa je bilo med njimi tudi čedalje več mrtvih celic.

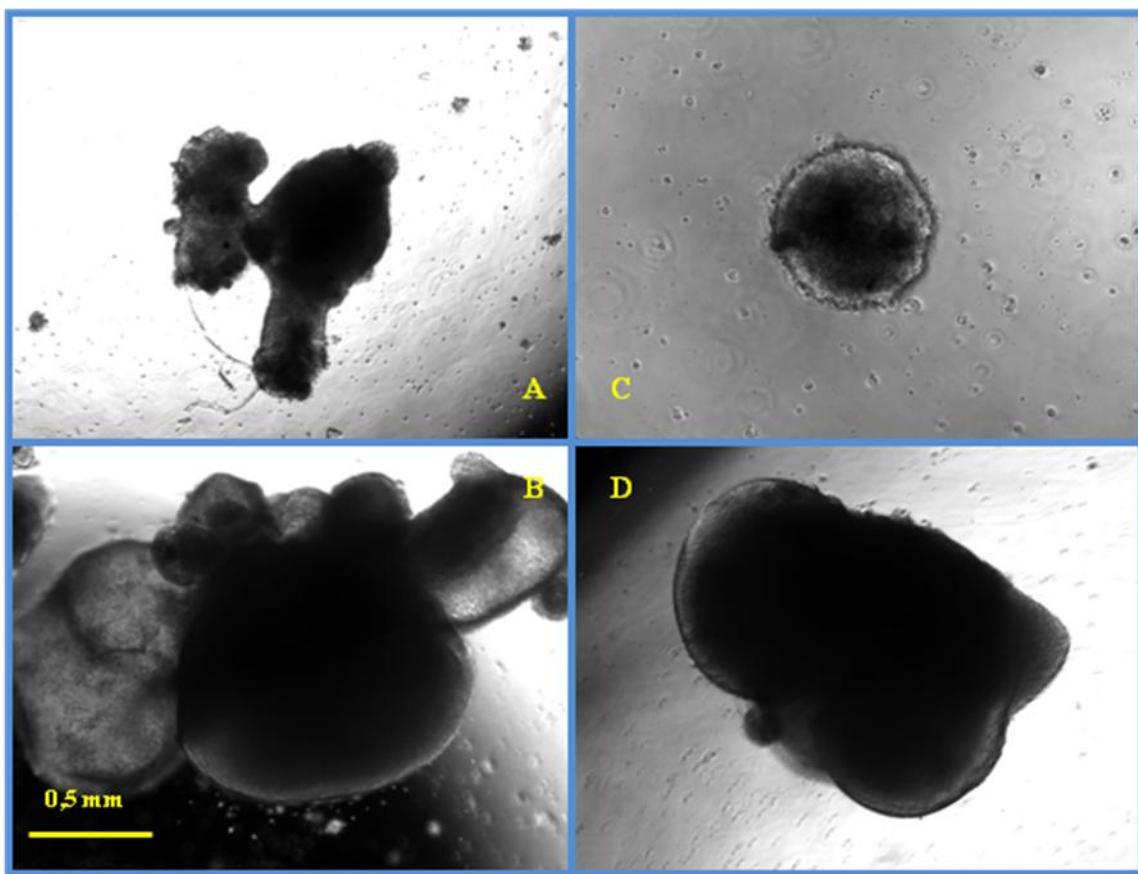


Slika 9: Gojenje hASC v HA po dnevih (A, B = dan 0; C, D = dan 1; E, F = dan 4). Slike v zgornji vrsti so narejene v BF, spodnje pa s pomočjo fluorescencije. Zeleno so obarvane žive celice, rdeče mrtve.

## 4.2 RAST IN DIFERENCIACIJA HESC

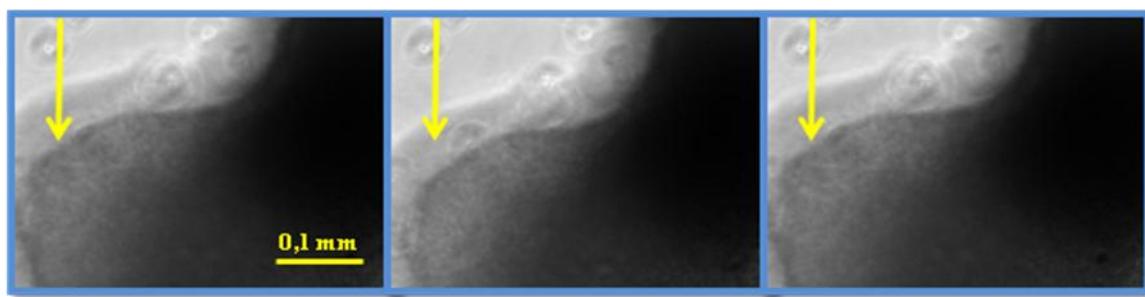
### 4.2.1 Celice v peletih

hESC smo gojili v peletih v gojišču KOD 41 dni. Po petih dneh smo napravili prve slike in videli, da je imelo predhodno centrifugiranje (100 G, 5 min) velik vpliv na morfologijo celičnih peletov. Tudi po 41 dneh je bilo opazno, da so peleti, ki so bili centrifugirani, bistveno bolj homogeni od tistih, ki jih nismo centrifugirali.



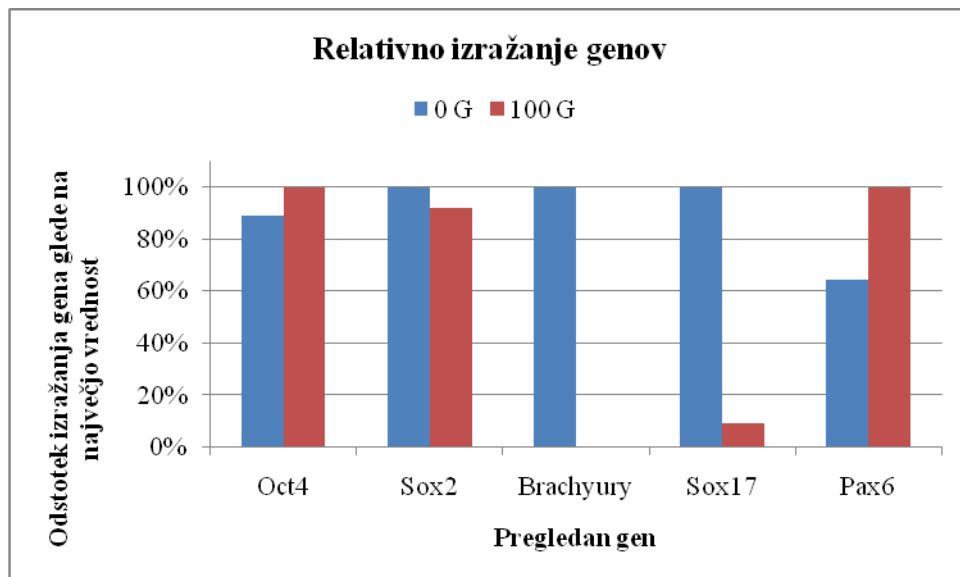
Slika 10: Celice v peletih po 5 dneh (A, C) in po 41 dneh (B, D) gojenja. Pelete A in B smo naredili s spontanim posedanjem celic, pelete C in D pa s centrifugo pri hitrosti 100 G.

Po 41 dneh gojenja smo opazili, da celični peleti na nekaterih mestih utripajo, kar nakazuje spontano diferenciacijo celic v srčni celični tip. Utripali so tako peleti, pripravljeni s spontanim usedanjem kot tisti, ki smo jih centrifugirali, vendar so prvi utripali bolj močno, po večji površini in na več mestih. Sklepali smo, da centrifugiranje in s tem gostota celic v peletih vpliva na razvojno pot, ki ji celice sledijo.



Slika 11: Utrajanje peleta, ki smo ga naredili s spontanim usedanjem celic in gojenjem 41 dni. Slike so posnete z intervalom 200 ms.

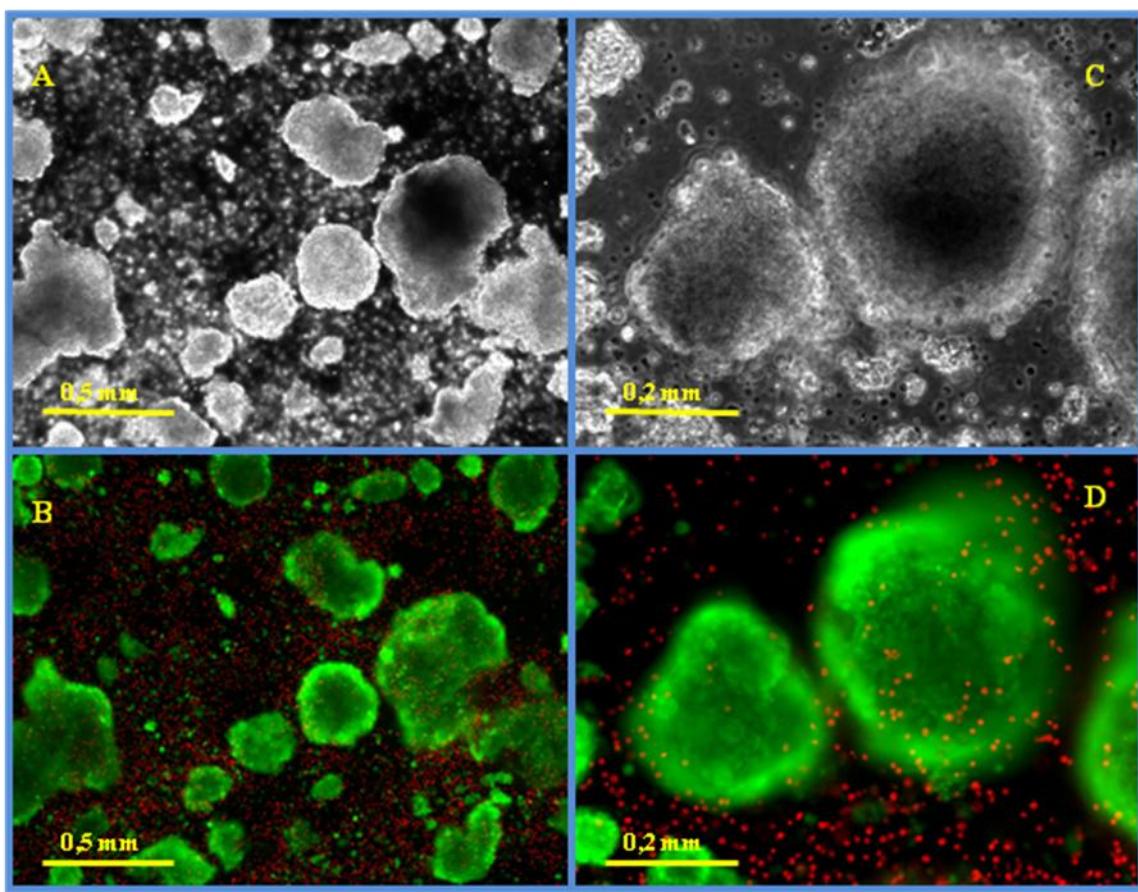
Po 41 dneh gojenja smo analizirali tudi izražanje genov Oct4, Sox2, Brachyury, Sox17 in Pax6. Opazili smo, da sta gena Oct4 in Sox2 izražena enakovrno v vseh celičnih skupkih. Gena Brachyury in Sox17 sta bistveno bolj izražena v celicah, ki jih nismo centrifugirali, izražanje gena Pax pa je rahlo povečano v celicah, ki so bile centrifugirane.



Slika 12: Izražanje genov v hESC peletih po 41 dneh gojenja. Izražanje smo najprej primerjali glede na hišni gen GAPD, nato pa smo jih primerjali med sabo.

#### 4.2.2 Celice v EB

hESC smo kot kontrolno skupino za primerjavo kulturam v hidrogelih gojili kot EB (gojišče KOD). Po 7 dneh gojenja smo preverili živost celic s testom L/D. Opazili smo, da hESC nerade rastejo posamezno in da jim bistveno bolj ustreza, kadar so v manjših ali večjih skupkih.

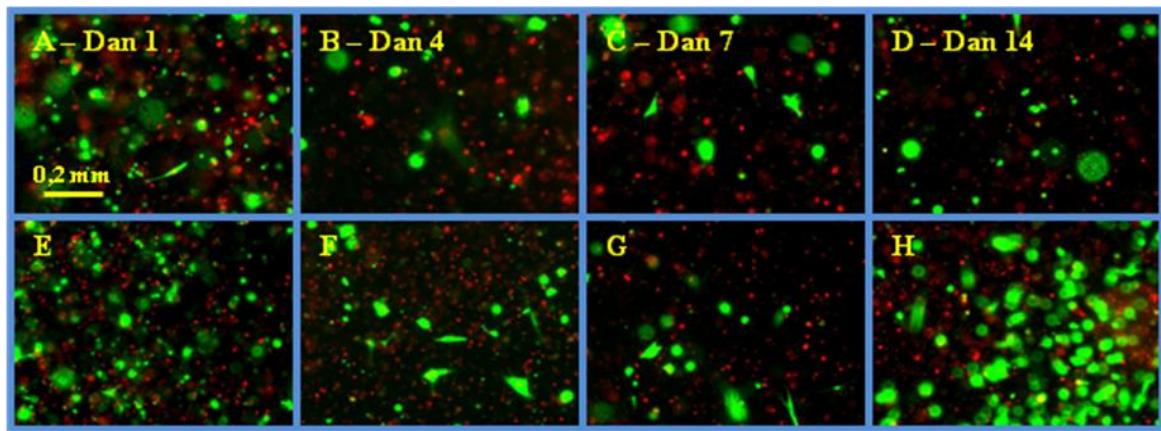


Slika 13: hESC gojene v EB 7 dni pri različnih povečavah. Zgornji sliki sta narejeni v BF, spodnji pa s pomočjo fluorescencije. Zeleno so obarvane žive celice, rdeče pa mrtve.

#### 4.2.3 Celice v hidrogelih

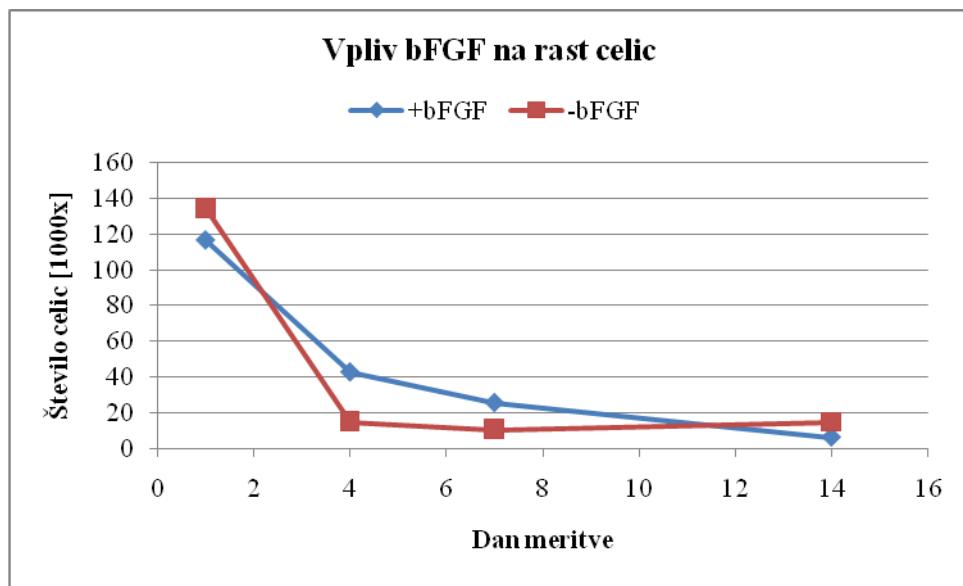
##### 4.2.3.1 Vpliv bFGF na posamezne celice v kolagenu

hESC smo najprej posamezno gojili v kolagenu (100.000 celic na kapljico) in ugotavljalni njihovo preživetje ter vpliv, ki bi ga imel nanje bFGF. Vendar pa se je izkazalo, da posamezne hESC zelo slabo preživijo v kolagenu. Opazili smo tudi, da so celice zelo slabo preživele ne glede na prisotnost bFGF, razen tam, kjer so se po naključju združile v skupke še pred enkapsulacijo (slika 14).



Slika 14: Serija slik testa L/D posameznih celic, gojenih v kolagenu (gojišče KODB) z in brez bFGF (gojišče KOD). Slike so narejene s pomočjo fluorescence. Zeleno so obarvane žive celice, rdeče pa mrtve. Celice v gelih od A do D so bile gojene s prisotnostjo bFGF v gojišču (4 ng/mL), celice v gelih od E do H pa brez bFGF. Preživijo le naključno združene celice (slika H).

Ocenili smo tudi število celic v kolagenskih kapljicah z določanjem količine DNA (slika 15). Ugotovili smo, da posamezne celice v kolagenskem gelu ne rastejo, ne glede na bFGF. S tem testom smo še potrdili ugotovitve testa L/D.



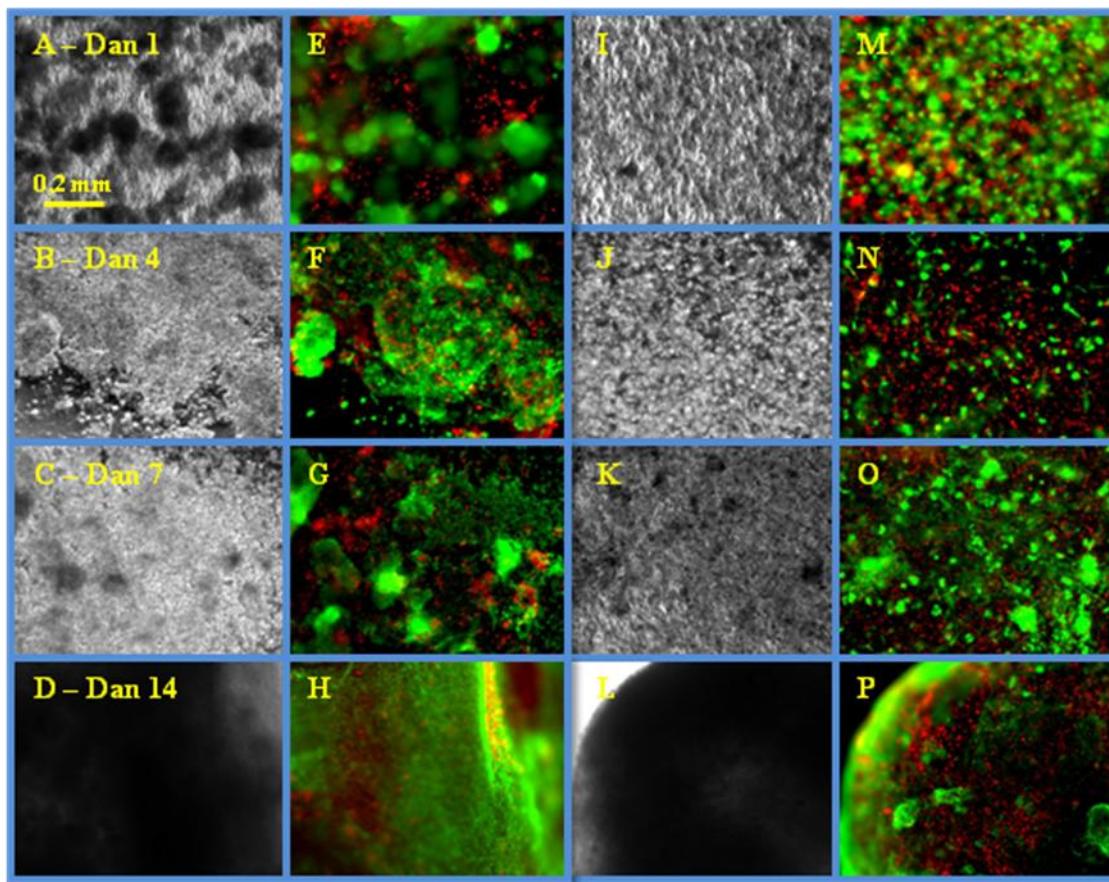
Slika 15: Število hESC v posamezni kapljici gela skozi čas smo določili z merjenjem količine DNA.

#### 4.2.3.2 Vpliv medceličnih stikov na rast hESC

Ker smo opazili, da posamezne hESC slabše preživijo v gelih, naključni skupki celic pa bolje, smo preverili tudi kako medcelični stiki vplivajo na preživetje.

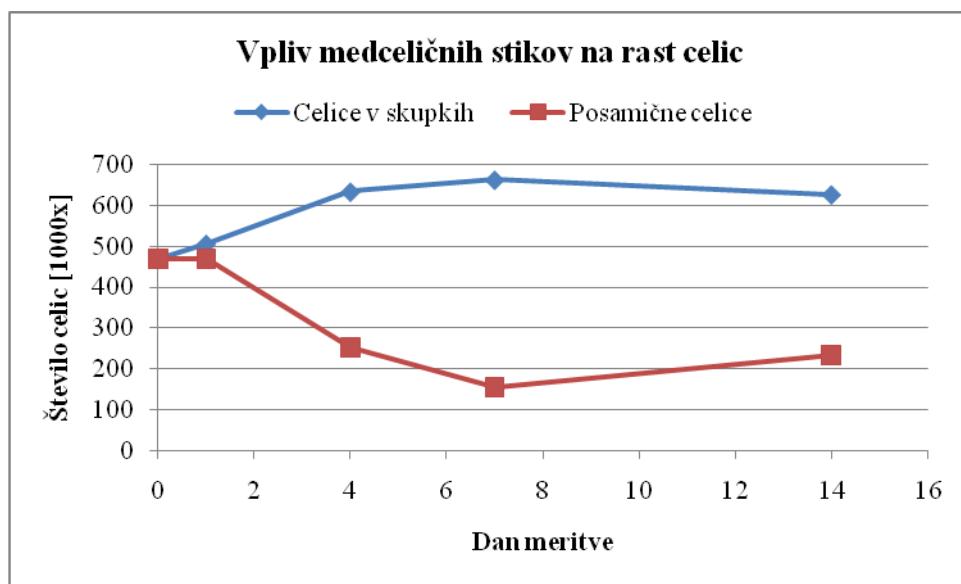
Celice smo v kolagenskem gelu gojili v skupkih ( $< 100 \mu\text{m}$ ), kot kontrolno skupino pa smo gojili v kolagenu tudi posamezne celice, pri čemer smo število celic povečali na 500.000 na kapljico. Opazili smo, da je večina posameznih celic mrtva, večina celic v skupkih pa

živa. Med 14 dnevi gojenja se celice postopno združujejo v skupke, krčijo gel skupaj in se tako zgoščujejo, kar se lepo vidi na slikah od A do D in I do L (slika 16).



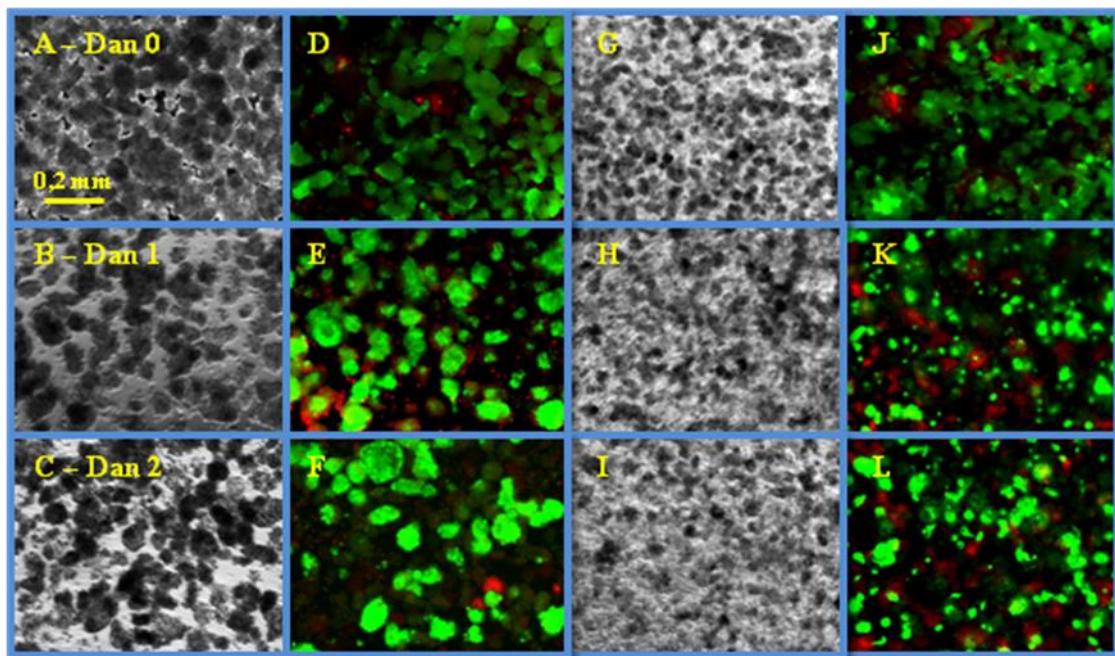
Slika 16: Primerjava živosti celic, gojenih v skupkih (CS) in posameznih celic (PC) v kolagenskem gelu. Slike od A do H so CS, slike od I do L so PC. Črno-bele slike so narejene v BF, zeleno-rdeče pa s fluorescenco. Zeleno so obarvane žive celice, rdeče pa mrtve.

Ocenili smo tudi število celic v kolagenskih kapljicah (v gojišču KOD) z določanjem količine DNA (slika 17). Ugotovili smo, da posamezne celice pričnejo odmirati že nekaj dni po enkapsulaciji, med tem ko se celicam v skupkih število povečuje. V zadnjih 7 dneh opazimo trend naraščanja števila celic tudi pri posameznih celicah, kar lahko pripisemo preživetju celic, ki so se znašle v skupkih po naključju.



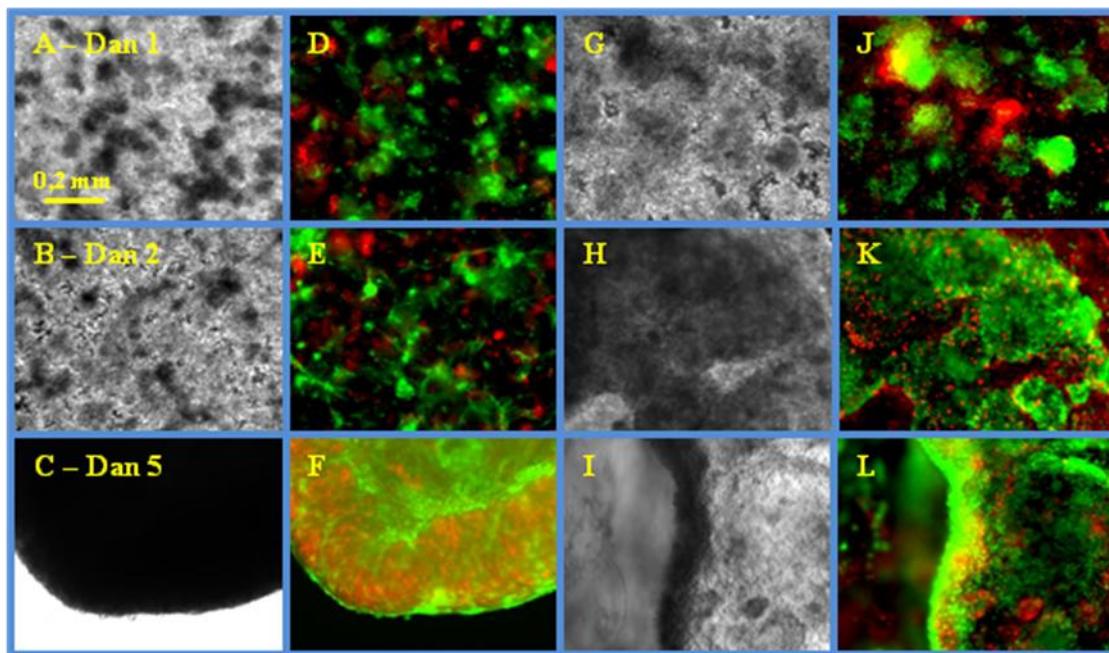
Slika 17: Število hESC med gojenjem v kolagenu, določeno na podlagi količine DNA.

Podobno kot pri ASC smo ugotavljali tudi preživetje hESC po enkapsulaciji v HA. Podobno smo primerjali živost posameznih celic in skupkov s testom L/D in prišli do enakih zaključkov, kot pri enkapsulaciji v kolagen; posamezne celice slabše preživijo enkapsulacijo (slika 18).



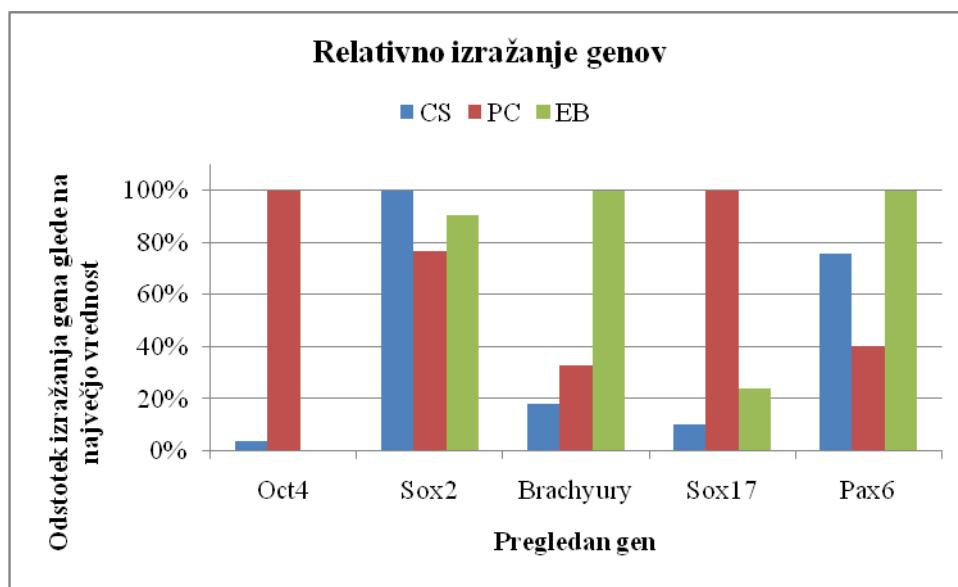
Slika 18: Primerjava živosti celic, gojenih v skupkih (CS) in posameznih celic (PC) v HA. Slike od A do F so CS, slike od G do L so PC. Črno-bele slike so narejene v BF, zeleno-rdeče pa s pomočjo fluorescence. Zeleno so obarvane žive celice, rdeče pa mrtve.

Želeli smo tudi preveriti, kako različne velikosti skupkov vplivajo na preživetje hESC. Ponovno smo opazili, da posamezne celice zelo slabo preživijo enkapsulacijo, velikost skupkov pa na njihovo preživetje ne igra pretirano velike vloge. Na po 5 dneh gojenja smo v obeh primerih videli deformacijo kolagenske kapljice, saj jo celice povlečejo skupaj (slika 19).



Slika 19: Živost skupkov hESC različnih velikosti v kolagenskem gelu. Črno-bele slike so narejene v BF, zeleno-rdeče pa s pomočjo fluorescence. Zeleno so obarvane žive celice, rdeče pa mrtve. Slike od A do F so skupki, manjši od 40  $\mu\text{m}$ , ujeti v kolagen. Slike od G do L so skupki velikosti od 40  $\mu\text{m}$  do 100  $\mu\text{m}$ , ujeti v kolagenu. Opazili smo, da celice bistveno bolje preživijo v skupkih.

hESC v skupkih (CS) in posameznim celicam (PC) smo preverili izražanje genov Oct4, Sox2, Brachyury, Sox17 in Pax6 po 7 dneh gojenja. Izražanje omenjenih genov smo primerjali z izražanjem v celicah v embrioidnih telescih (EB), prav tako po 7 dneh gojenja. Gen Sox2 je bil enakomerno izražen v vseh treh načinih gojenja celic. V PC sta bila bistveno bolj izražena gena Oct4 in Sox17, vendar pa so PC v primerjavi s CS in EB izražale manj gena Pax6. Celice v EB so izražale več gena Brachyury.

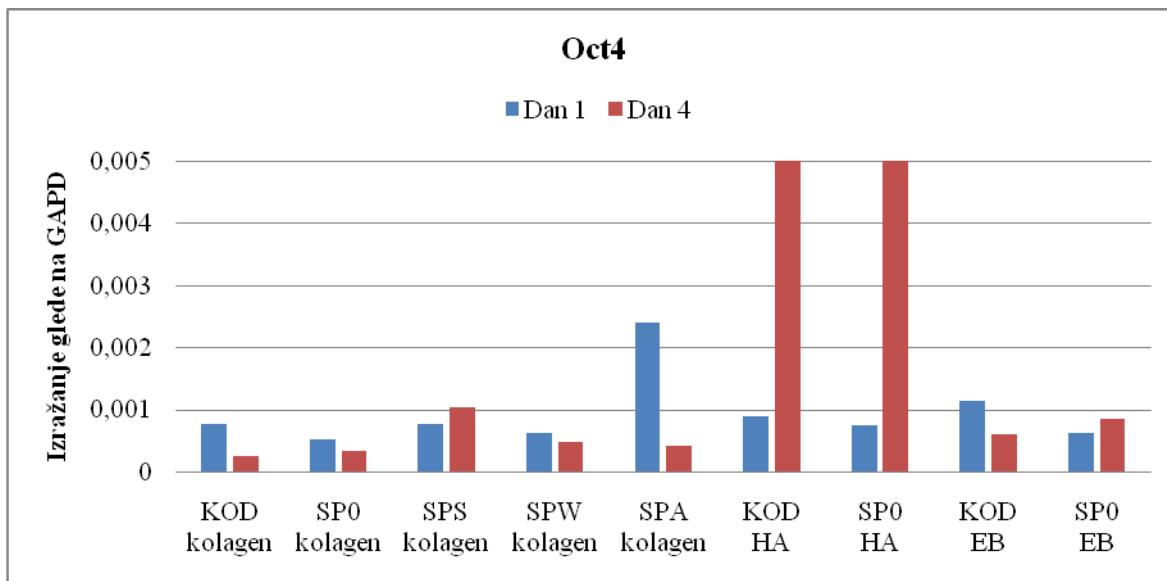


Slika 20: Primerjava izražanja genov med celicami v skupkih (CS), posameznimi celicami (PC) ter embrioidnimi telesci (EB) po 7 dneh gojenja v gojišču KOD. Izražanje genov smo najprej primerjali z izražanjem hišnega gena GAPD, nato pa še med poskusi.

#### 4.2.3.3 Vpliv gojišč na rast in diferenciacijo hESC

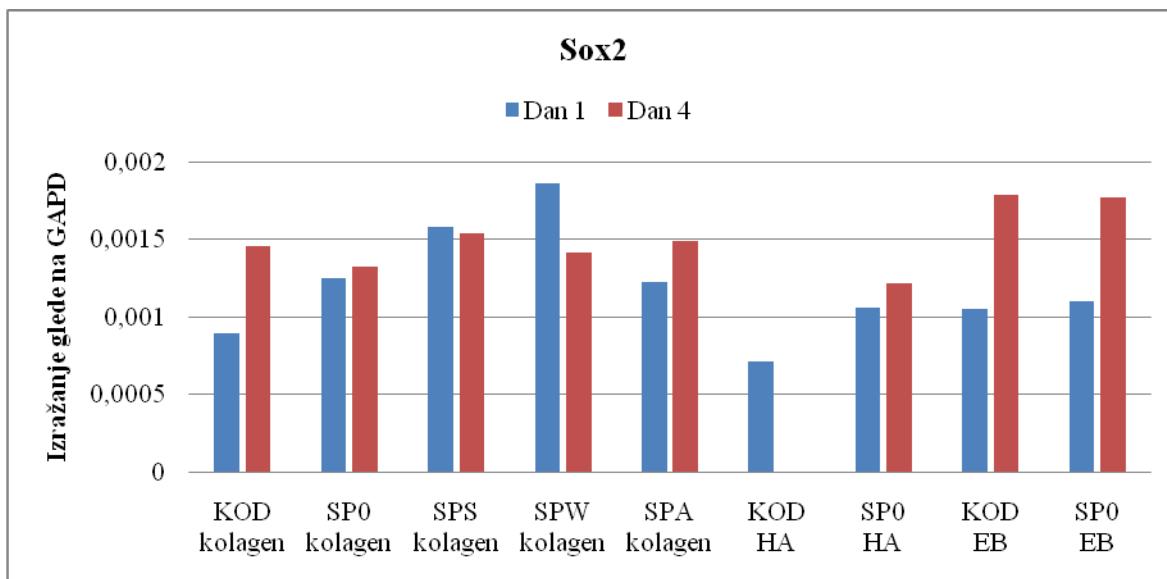
Celice smo gojili v kolagenskem gelu, v HA in kot kontrolno skupino tudi v EB v različnih gojiščih. Celice smo gojili v skupkih, pri čemer je bilo skupno število 250.000 celic na kapljico. Med gojenjem smo opazovali njihovo živost, vendar razlik med poskusi nismo opazili, rezultati pa so bili podobni prejšnjim poskusom (slika 16, 18 in 19). Analizirali smo tudi izražanje genov na dan 1 in dan 4 in tako ugotavljali vzorce diferenciacije celic ob prisotnosti različnih rastnih faktorjev.

Izražanje gena Oct4 je bilo na dan 4 bistveno povečano v celicah, gojenih v HA (približno 50 krat). Celice v kolagenu in EB so nakazovale trend zmanjševanja izražanja tega gena (razen celice v kolagenu v gojišču SPS ter celice v EB v gojišču SP0, vendar tudi te niso kazale bistvenega povečanja).



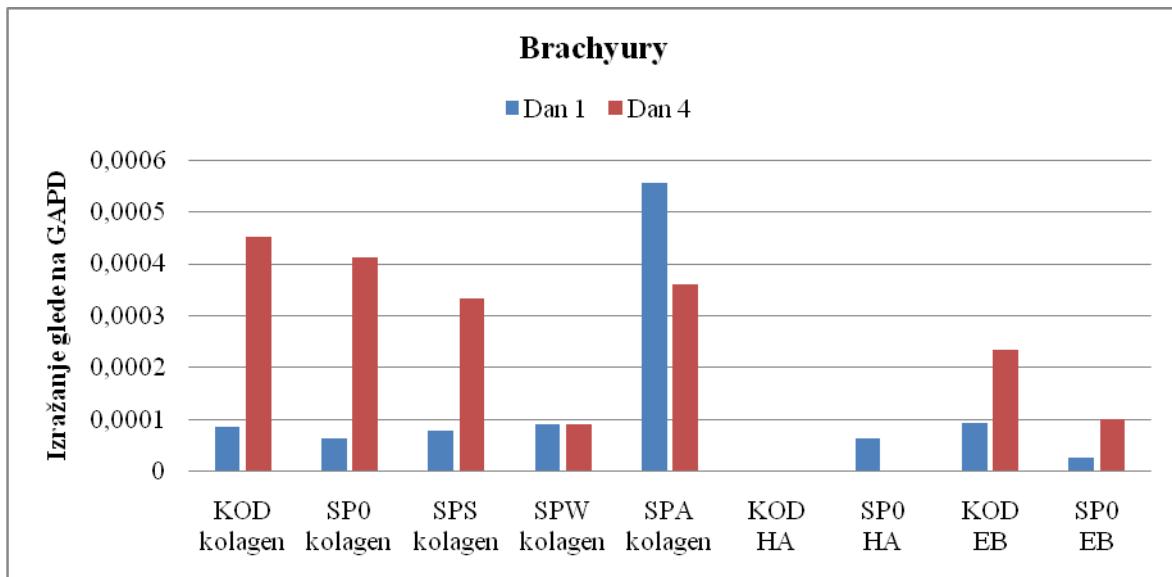
Slika 21: Izražanje gena Oct4 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.

Izražanje gena Sox2 je večinoma ostalo enakomerno. Pri celicah, gojenih v HA v gojišču KOD nismo zaznali izražanja. V celicah v EB smo zaznali povečanje izražanja (skoraj dvakratno) med dnevoma 1 in 4.



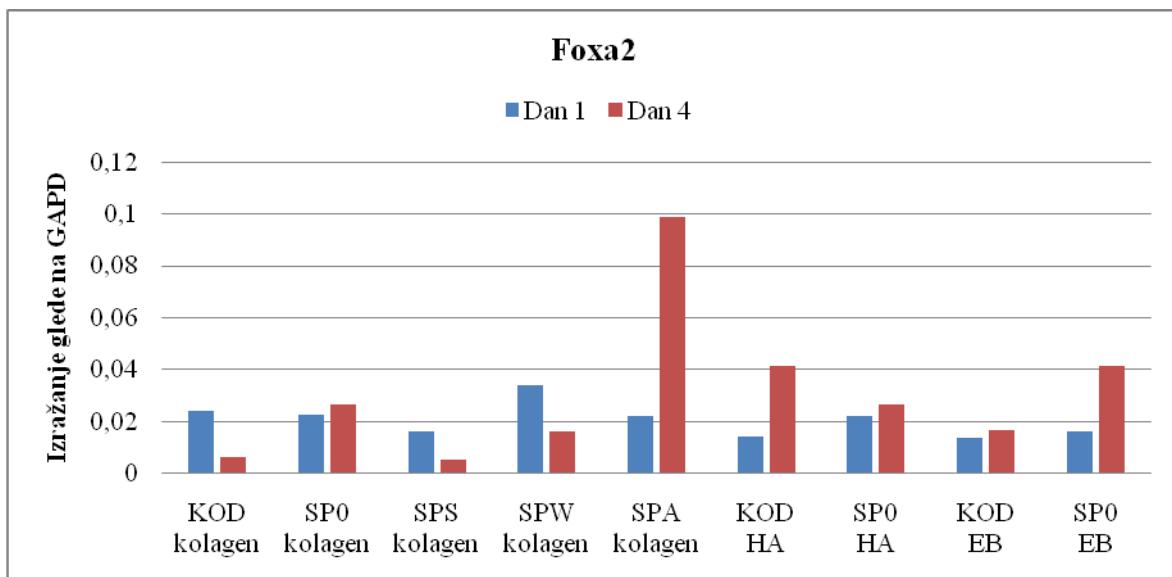
Slika 22: Izražanje gena Sox2 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.

Izražanje gena Brachyury se je četrti dan povišalo praktično v vseh različnih skupinah celic, gojenih v kolagenu in EB. Izjema so celice, gojene v SPW, ki kažejo nespremenjeno izražanje tega gena. Celice, gojene v SPA, so imele na dan 1 najvišje izražanje med vsemi skupinami, ki pa se je nekoliko zmanjšalo do dneva 4. Celice v HA kažejo zanemarljivo malo izražanja tega gena.



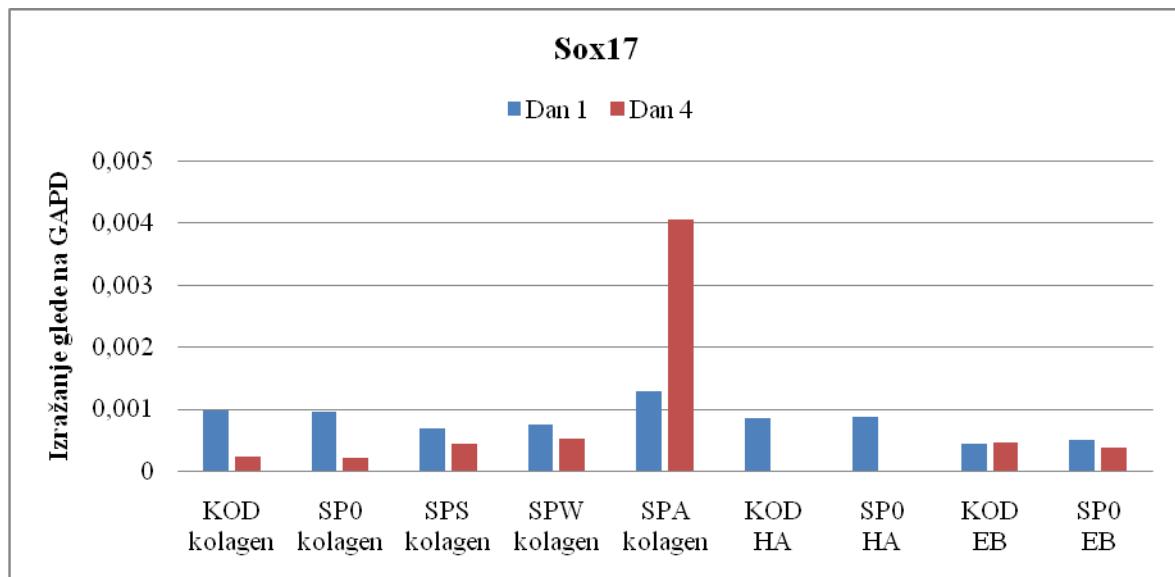
Slika 23: Izražanje gena Brachyury v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.

Trend izražanja gena Foxa2 je ostal praktično nespremenjen pri večini celic. Najbolj opazna izjema so bile celice, gojene v kolagenu in SPA, ki so kazale skoraj petkrat povečano izražanje tega gena po štirih dneh gojenja.



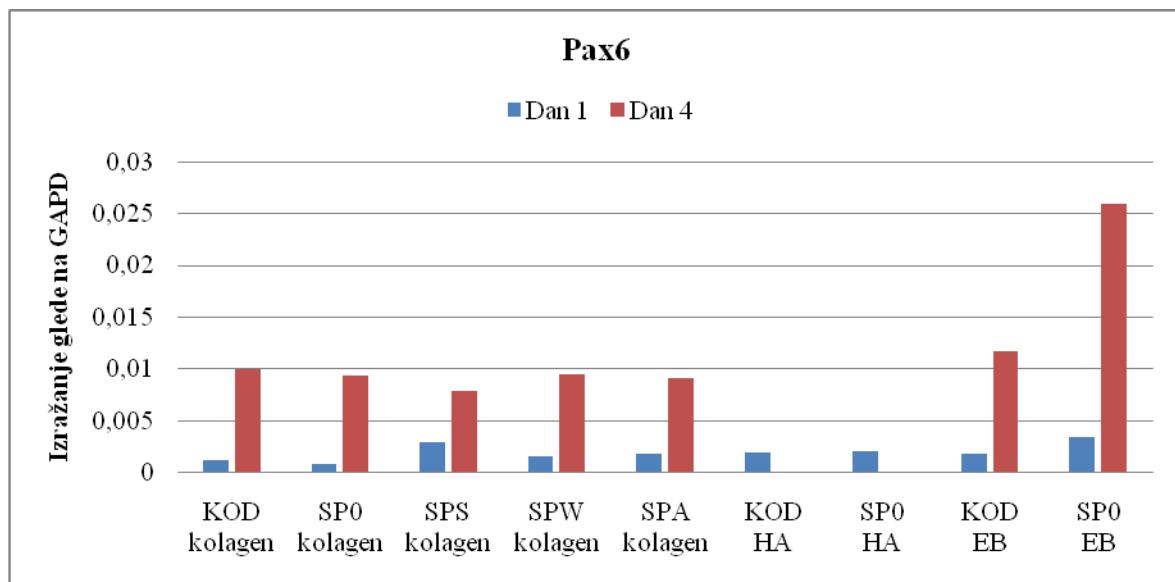
Slika 24: Izražanje gena Foxa2 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.

Celice so na splošno kazale trend zmanjševanja izražanja gena Sox17. Celice, gojene v SPA in kolagenu pa so edine izražale skoraj štirikratno povečanje izražanja. Celice v HA četrti dan praktično niso več izražale tega gena.



Slika 25: Izražanje gena Sox17 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.

Vse celice, ki so bile gojene v kolagenu ali kot EB, so kazale trend povečevanja izražanja gena Pax6. Pri celicah, gojenih v HA, po 4 dneh izražanja Pax 6 nismo več zaznali.



Slika 26: Izražanje gena Pax6 v celicah, gojenih v različnih 3D okoljih in gojiščih.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini je usmerjanje celične diferenciacije ključnega pomena, če želimo popraviti in obnoviti delovanje obolelih tkiv ali organov. Dandanes so terapije s človeškimi matičnimi celicami, tako odraslimi kot embrionalnimi, šele v začetnih fazah kliničnih študij. Pred razširjenjem celičnih terapij v rutinsko rabo bo potrebno natančno poznavanje in kontrola usmerjanja diferenciacije celic ter doseganje stabilnega funkcionalnega fenotipa, ki bo zagotavljal varno uporabo.

3D okolje, v katerem matične celice rastejo, je eden od pomembnih faktorjev, ki vplivajo na diferenciacijo celic. 3D okolje si lahko sintetizirajo celice same, lahko pa jih nasadimo in jih gojimo v 3D nosilcih, kot so to hidrogeli, ki predstavljajo osnovno matrico za izgradnjo novega tkiva. Vsem hidrogelom je skupno, da jih je relativno enostavno oblikovati, prav tako je enostavna celična enkapsulacija. Hidrogeli za celice predstavljajo primerno okolje, ki je v nekaterih primerih podobno naravnemu tkivu. V hidrogelih lahko celice tudi migrirajo, prenašajo signale in dobivajo hranila. Hidrogeli so uporabni tudi za implantacijo, saj bi z oblikovanjem gela lahko pridobili kos tkiva *in vitro*, ki je poljubne oblike, oz. se prilagodi obliki mesta implantacije.

Najbolj osnovna oblika 3D okolja je združevanje in gojenje celic v celičnih skupkih. V našem delu smo preizkušali različne metode priprave celičnih skupkov, in opazovali, kako te vplivajo na spontano diferenciacijo hASC in hECS.

Gojenje celic v peletih se pogosto uporablja kot model diferenciacije odraslih matičnih celic, uporabljeni pa je bila tudi že za hESC (Johnstone in sod., 1998; Ungrin in sod., 2008). Nas je zanimalo, če gostota takšnih skupkov vpliva na samo pot diferenciacije, zato smo celice centrifugirali ob različnih hitrostih in tako pripravili celične pelete. Na podlagi rezultatov smo lahko zaključili, da centrifugiranje ne vpliva bistveno na morfologijo, živost in zgodnje stopnje diferenciacije celičnih peletov pri hASC (do 7 dni). Iz poskusa L/D (slika 3) smo ugotovili, da je živost celic v peletih med skupinami podobna. Zanimivo je, da je bilo bistveno več celic mrtvih v notranjosti skupka kot na površini skupka, kar gre pripisati slabšemu dostopu hranil. V *in vitro* gojenih tkivnih modelih je bilo ugotovljeno, da je dostop hranil z difuzijo omejen na nekaj 100 µm, kar vodi v slabše preživetje celic v notranjosti (Burdick in Vunjak-Novaković, 2009). Za pripravo večjih tkivnih nadomestkov je potrebno uporabiti dinamične sisteme gojenja *in vitro*.

Prav tako smo na podlagi analize izražanja genov transkripcijskih faktorjev CBFA1, Sox9 in PPAR (označevalcev osteogeneze, hondogeneze in adipogeneze), ki je bilo primerljivo med skupinami, zaključili, da centrifugiranje ni vplivalo na spontano diferenciacijo hASC v peletih. Opazili smo tudi, da sta bili ravni izražanja genov Sox9 in PPAR primerljivi med obema tipoma kultur skupkov - med peleti ter gojenjem celic v mikromasah. Morebiti bi vpliv gostote skupkov zaznali po daljšem gojenju (kot smo to naredili s peleti hESC), ali pa bi prišlo do večjih sprememb ob sočasnem dodatku diferenciacijskih faktorjev. Raziskave so namreč pokazale (Alonso in sod., 2008; Gabbay in sod. 2006), da kolagen v ASC inducira osteogenezo tako *in vivo* kot *in vitro*. Za večjo natančnost bi morali pregledati tudi izražanje drugih genov, značilnih za osteogenezo (npr. alkalna fosfataza, osteoponin,

osteonektin, osteokalcin, kolagen I in II), ter te izražanje teh genov primerjati z izražanjem genov v hASC, gojenih v običajni gostoti (5000 celic na cm<sup>2</sup>).

Pri hESC se je izkazalo, da centrifugiranje močno vpliva na morfologijo celičnega skupka, kot tudi na izražanje genov. Embrionalna telesca, ki so se razvila iz peletov po centrifugiraju, so imela rahlo povečano izražanje gena Pax6, kar nakazuje na spontano diferenciacijo v ektoderm (Bauwens in sod., 2008). Celice, ki jih nismo centrifugirali, pa so izražale bistveno več gena Brachyury in Sox17 (Nakanishi in sod., 2008), ki sta značilna za mezo- in endoderm. Da so šle celice v to razvojno smer nakazuje tudi dejstvo, da so bolj utripale, kar je značilno za srčni celični tip (Ungrin in sod. 2008).

Osnovni način, kako v hESC celicah sprožiti diferenciacijo, je nasaditev kolonij oz. delov kolonij v neadherentne petrijevke in formacija EB (Itskovitz-Eldor in sod. 2000; Ungrin in sod., 2008). Tudi v naših poskusih smo uporabljali diferenciacijo v EB, še pred tem pa smo preverili njihovo živost. Videli smo, da so žive le celice, ki so tvorile EB, posamezne celice pa so pomrle. EB smo tudi analizirali za izražanje genov, in ugotavliali vzorce izražanja v primerjavi z drugimi poskusi, saj je za celice v EB značilno, da se razvijejo v vse tri razvojne poti, endo-, mezo- in ektoderm.

3D okolja celičnih skupkov smo primerjali z gojenjem celic v hidrogelih iz kolagena in hialuronske kisline (HA). Najprej smo v teh dveh hidrogelih gojili hASC, in ugotovili, da je kolagen primernejše okolje za njihovo rast kot HA (pri uporabljenih postopkih priprave). V kolagenskem gelu je bila živost celic visoka, hkrati pa je naraščalo število celic in celokupna metabolna aktivnost. Celice smo pri enaki gostoti gojili tudi v mikromasi in opazili, da so tako rast ter metabolna aktivnost (slika 5), živost celic (slika 6) in izražanje genov (slika 7) kljub manjšim razlikam zelo podobni med celicami v kolagenu in mikromasi. Celice so se na kolagenski nosilec pritrjale podobno, kot se običajno na dno gojilne posode (bile so značilne vretenaste oblike). V nasprotju s kolagenom se hidrogel HA ni izkazal kot najprimernejše okolje za hASC, saj njihova metabolna aktivnost (slika 8) ni naraščala in je bila bistveno manjša v primerjavi z metabolno aktivnostjo celic v kolagenu. Do enakega zaključka smo prišli tudi z analizo živosti celic v HA, ki je pokazala, da celice v HA postopno odmirajo (slika 9), saj je naraščalo število mrtvih celic. Razlog za to so lahko prosti radikali, ki ostanejo po obsevanju gela z UV žarnico, čeprav je bilo pokazano v podobnem poskusu (Gerecht in sod., 2007), da obsevanje ne poškoduje celične DNA. Druga možnost je, da je fotoiniciator, potreben za polimerizacijo HA, toksičen za celice in povzroči njihovo odmiranje. Verjetno bi bilo mogoče preživetje celic izboljšati z optimizacijo postopka enkapsulacije (znižati koncentracijo fotoiniciatorja ali skrajšati izpostavljenost UV svetlobi)

Kot smo omenili v pri pregledu objav, hESC za ohranitev nediferenciranega stanja potrebujejo bFGF ter FL, na katerega se pripenjajo. Pri naših prvih poskusih v kolagenskem gelu smo zato žeeli preveriti, kako te celice preživijo kot posamezne celice po enkapsulaciji v kolagen, ter če faktor bFGF vliva na njihovo živost in rast. Ugotovili smo, da posamezne celice slabo preživijo enkapsulacijo ne glede na prisotnost bFGF. Sklepamo, da je narava hESC takšna, da potrebujejo tesne medcelične stike za preživetje (kar nakazuje tipična rast hESC v kolonijah, kjer imajo stike s FL in drugimi hESC). Da celice ne preživijo, je razvidno tako iz rezultatov testa L/D (slika 14), kot iz upadanja

števila celic (slika 15). Na slikah je tudi opazno, da so edine žive celice tiste, ki so se med postopkom enkapsulacije ali med gojenjem naključno združile v skupke. Na osnovi teh rezultatov smo že zeleli natančneje ugotoviti, kakšen pomen imajo medcelični stiki za preživetje hESC, ter ali lahko povišanje koncentracije celic v hidrogelu pripomore k boljšemu preživetju. Na podlagi poskusov gojenja hESC v obeh gelih, primerjav gojenja skupkov in posameznih celic, ter gojenja skupkov različnih velikosti smo lahko zaključili, da so hESC bistveno bolje preživele v skupkih kot posamezne celice (slika 16, 17 in 18). Do enakega zaključka kot v prvem poskusu smo prišli tudi po določitvi števila celic v kapljicah, ki so vsebovale 5-krat višje število celic (slika 17). Opazili smo, da imajo PC padajoč trend, ki pa začne rahlo naraščati v zadnjih sedmih dneh. To si lahko razložimo kot rast tistih celic, ki so se uspele združiti v skupke znotraj hidrogela, vendar njihova rast na začetku ni bila opazna zaradi množičnega odmiranja PC.

Na podlagi analize izražanja genov (slika 20) smo ugotovili, da celični stiki v kolagenu stimulirajo hESC k diferenciaciji, saj je raven izražanja gena Oct4, ki označuje pluripotentnost, zelo nizka tako pri celicah v skupkih, kot pri celicah v EB. Opazili smo tudi razlike v vzorcu spontane celične diferenciacije. V EB so bili močno izrazeni geni, značilni za vse tri zarodne plasti, celice v skupkih znotraj kolagen pa razmeroma močno izražale gen Pax6, ki nakazuje diferenciacijo v smeri ektoderma.

Da bi dosegli večji nadzor nad usmeritvijo in diferenciacijo hESC v mezodermalen celični tip, smo testirali in primerjali vplive različnih gojišč z vplivi različnih 3D okolij. hESC smo gojili v kolagenu, HA in EB, v gojišča pa smo dodajali različne rastne faktorje (Wnt, aktivin, bFGF, BMP-4), ki smo jih izbrali na osnovi predhodnih študij iz literature (preglednica 2). Ugotovili smo, da celice v kolagenu v vseh skupinah kažejo podobne vzorce izražanja genov, ne glede na gojišče, v katerem smo jih gojili. Izjema so celice, gojene v SPA, ki vsebuje aktivin. Geni Brachyury, Sox17 in Foxa2 so bili v teh celicah bolj izraženi, kar nakazuje usmerjanje diferenciacije v primitivno progo (PS) in dalje v endoderm, kar je bilo tudi pričakovati (Murry in Keller, 2008). V izražanju vseh ostalih genov so te celice podobne celicam ostalih skupin v kolagenu. Opazili smo, da imajo celice v kolagenu zelo podoben profil izražanja celicam v EB, razen ravni izražanja gena Brachyury, ki je bilo nekoliko višje v kolagenu (kar se ni ujemalo s predhodnim poskusom, kjer smo izražanje opazovali po 7 dneh gojenja (slika 20). Nasprotno celice v EB kažejo večje izražanje gena Pax6, kar nakazuje, da to okolje nekoliko bolj spodbuja spontano diferenciacijo v smer ektoderma (podobno smo opazili tudi v predhodnem poskusu, slika 20).

Nasprotno z zaključki poskusov gojenja v kolagenu smo opazili pri celicah v HA močno povečano izražanje gena Oct4 (tudi do 50 krat) ter praktično zanemarljivo izražanje genov Brachyury, Sox17 in Pax6. Ti rezultati nakazujejo, da so celice v HA bistveno bolj nediferencirane kot v kolagenu. HA je prisotna v blastocisti, njena koncentracija pa se z razvojem manjša, zato sklepamo, da HA spodbuja nediferencirano rast (Gerecht in sod., 2007). Zaključimo lahko, da sestava nosilca močno vpliva na celice, saj je kolagen stimuliral spontano diferenciacijo hESC, v nasprotju s HA, ki stimulira nediferencirano rast. Opazili smo tudi, da obstaja med našimi poskusi precejšnja variabilnosti, ki je lahko posledica variacij v posamičnih pripravkih matičnih celic, saj so te nagnjene k spontani diferenciaciji že med gojenjem na FL.

Na podlagi naših poskusov lahko zaključimo, da 3D okolje močno vpliva na preživetje, rast in diferenciacijo matičnih celic. Ugotovili smo, da so medcelični stiki nujni za preživetje hESC, in omogočajo rast ter spontano diferenciacijo celic v 3D okolju. hASC so znotraj hidrogelov preživele in rastle tudi kot posamične celice, prisotnost kolagenskega nosilca pa je vplivala na vzorce njihove diferenciacije v primerjavi z gojenjem celičnih skupkov. Tip (sestava) hidrogela je vplival tako na preživetje kot na usodo hESC, saj so celice v kolagenskem nosilcu rastle in se diferencirale, v HA pa so izražale nediferencirani fenotip in odsotnost rasti. Zaključimo lahko, da so zaradi relativno enostavne enkapsulacije, možnosti oblikovanja ter zaradi ugodnega vpliva, ki ga imajo na celice, hidrogeli vsekakor eden izmed možnih celičnih nosilcev, ki bodo uporabljeni v sodobni medicini. Naši rezultati bodo lahko pripomogli k nadaljnjam raziskavam uporabe hidrogelov kot nosilcev za matične celice, njihovi uporabi pri natančnejšem usmerjanju matičnih celic v različne tipe diferenciranih celic ter pri pripravi tkivnih nadomestkov.

## 6 POVZETEK

Tkivno inženirstvo in regenerativna medicina obljudljata zdravila za številne bolezni, ki jih sedaj ni mogoče ozdraviti. Raziskovalci želijo razviti različne materiale in v laboratoriju vzgojiti različne tipe celic, ki bi jih lahko nato vsadili bolniku, ki jih potrebuje. Glavni vir celic za tkivno inženirstvo predstavljajo matične celice zaradi njihove sposobnosti gojenja *in vitro*, samoobnavljanja ter sposobnosti diferenciacije v različne celične tipe in tkiva.

Uporaba matičnih celic v medicini nikakor ni moderen pristop, saj se transplantacija hematopoetskih celic iz kostnega mozga uporablja rutinsko že več kot 50 let z visoko učinkovitostjo. Matične celice so lahko embrionalne (izvirajo iz blastociste zarodkov) ali odrasle (izvirajo iz tkiv odraslega človeka, npr. mezenhimske, hematopoetske). Glavni problem matičnih celic, ki jih želimo manipulirati v laboratoriju, je težko nadzorovana diferenciacija v želeno smer. To še posebej velja za embrionalne matične celice, saj so izmed vseh matičnih celic te najbolj potentne (lahko tvorijo tkiva vseh treh zarodnih plasti). Če diferenciacija *in vitro* ne bi bila dovolj natančna, bi lahko celice po implantaciji tvorile teratome, ali pa bi se diferencirale v napačno tkivo.

Raziskovalci poskušajo na številne načine nadzorovati diferenciacijo. Običajni pristopi temeljijo na posnemanju celičnega naravnega okolja skozi razvoj in na ta način prilagajanje sestave celičnega gojišča (dodajanje raznih rastnih faktorjev). Vendar pa čedalje več raziskav upošteva, da je pomemben dejavnik pri diferenciaciji matičnih celic tudi njihovo tridimenzionalno (3D) okolje, ki je različno in specifično za vsako tkivo. Zato so razvili številne načine, kako oblikovati 3D okolje celic. Osnovni temeljijo na enostavnem združevanju celic, ki nato same sintetizirajo svoj izvencielični matriks (celični peleti, embrioidna telesca), drugi pa vključujejo izdelavo naravnih ali sintetičnih celičnih nosilcev z raznimi mehanskimi in kemičnimi lastnostmi. Med njimi so pomembni hidrogeli, kot so kolagen, alginat in hialuronska kislina (HA).

V raziskovalnem delu te diplomske naloge smo želeli preveriti, kako 3D okolje vpliva na rast in diferenciacijo človeških matičnih celic. Predvidevali smo, da bo 3D okolje imelo signifikanten vpliv, ki je primerljiv z vplivom rastnih faktorjev.

Poskuse smo izvajali na človeških embrionalnih matičnih celicah (hESC) ter na matičnih celicah iz maščevja (hASC), izoliranih iz lipoaspirata. Celice smo gojili v različnih 3D okoljih, kot so embrioidna telesca (EB), celični peleti, ter v kolagenskem gelu in gelu iz HA. Za rast in diferenciacijo smo celice karakterizirali z različnimi metodami. Živost celic smo ocenili s testom Live/Dead (žive celiceobarva zeleno, mrtve pa rdeče), njihovo metabolno aktivnost smo ocenili s testom XTT (metabolno aktivne celice oksidirajo tetrazolijev sol, ki se pri tem barva rumeno), spremljali smo število celic z merjenjem DNA, za smer diferenciacije pa smo celicam preverili izražanje genov z metodo PCR v realnem času.

Izkazalo se je, da so hASC v kolagenskem gelu rastle bolje kot v HA. hASC so adherentne celice, ki so gel izkoristile za pritrjevanje, rast celic pa je bila praktično enaka kontrolnim

skupinam. Prav tako ni bilo opaziti posebnih razlik v diferenciaciji med celicami v kolagenu in kontrolnimi skupinami.

Drugače pa je bilo pri gojenju hESC. Izkazalo se je, da posamezne celice ne preživijo niti v kolagenskem gelu, niti v HA. Zato smo morali pred enkapsulacijo v gel oblikovati celične skupke, ki so nato kazali bistveno večje preživetje. hESC smo gojili v obeh gelih, v gojišče pa smo jim dodajali različne rastne faktorje, ki naj bi usmerjali diferenciacijo v različne celične tipe. Kot kontrolno skupino smo gojili hESC v obliki EB, za katere je znano, da se diferencirajo v celične tipe vseh treh zarodnih plasti. Po analizi izražanja genov smo opazili, da rastni faktorji res vplivajo na diferenciacijo, vendar smo bistveno večje razlike opazili med različnimi geli. Opazili smo, da so bile celice, gojene v HA, bistveno bolj nediferencirane. Ta zaključek je smiseln, saj je HA prisoten v zgodnjih fazah razvoja (blastocista), takrat, ko so celice najbolj potentne. Nasprotno smo ugotovili, da gojenje v kolagenskem gelu spodbuja podobno diferenciacijo kot če s celicami tvorimo EB.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da lahko različno celično okolje bistveno vpliva na celično diferenciacijo. V kombinaciji z rastnimi faktorji, hidrogeli ponujajo različne možnosti za gojenje matičnih celic. Smo mnenja, da bodo zato dobili svojo funkcijo v tkivnem inženirstvu in regenerativni medicini.

## 7 VIRI

- Alonso M., Claros S., Becerra J., Andrades J. A. 2008. The effect of type I collagen on osteochondrogenic differentiation in adipose-derived stromal cells *in vivo*. *Cyotherapy*, 11, 1: 97-99.
- Amit M., Shariki C., Margulets V., Itskovitz-Eldor J. 2004. Feeder layer and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biology of Reproduction*, 70: 837–845
- Bauwens C. L., Peerani R., Niebruegge S., Woodhouse K. A., Kumacheva E., Husain M., Zandstra P. W. 2008. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. *Stem Cells*, 26, 9: 2300-2310
- Bell E., Ehflich P., Buttle D. J., Nakatsuji T. 1981. Living tissue formed *in vitro* and accepted as skin-equivalent of full thickness. *Science*, 221: 1052-54
- Burdick J. A., Vunjak-Novaković G. 2009. Review: Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Engineering*, 15, 2: 205-219
- Burdick J. A. ,Chung C., Jia X., Randolph M. A., Langer R. 2005. Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks. *Biomacromolecules*, 6. 1: 386-391.
- Burke J. F., Yannas I. V., Quimby W. C., Bondoc C. C., Jung W. K. 1981. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of Surgery*, 194: 413-48
- Cerdan C., Rouleau A., Bhatia M. 2004. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood*, 103: 2504–2512
- Conget P. A., Minguell J. J. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of Cell Physiology*, 181,1: 67–73
- Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology*, 4, 5: 267–274
- Gabbay J. S., Heller J. B., Mitchell S. A., Zuk P. A., Spoon D. B., Wasson K. L., Jarrahy R., Benhaim P., Bradley J. P. 2006 Osteogenic potentiation of human adipose-derived stem cells in a 3-dimensional matrix. *Annals of Plastic Surgery*, 57, 1: 89-93.
- Gerecht-Nir S., Ziskind A., Cohen S., Itskovitz-Eldor J. 2003. Human embryonic stem cells as an *in vitro* model for human vascular development and the induction of vascular differentiation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 83, 12: 1811-1820

Gerecht-Nir S., Cohen S., Ziskind A., Itskovitz-Eldor J. 2004. Three-dimensional porous alginate scaffolds provide a conducive environment for generation of well-vascularized embryoid bodies from human embryonic stem cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 3: 313-320

Gerecht S., Burdick J. A., Ferreira L. S., Townsend S. A., Langer R., Gordana Vunjak-Novaković G. 2007. Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells. *PNAS*, 104: 11298-11303

Geron Corporation. 2009. Geron receives FDA clearance to begin world's first human clinical trial of embryonic stem cell-based therapy. Geron Corporation  
<http://www.geron.com/grnopc1clearance/grnopc1-backgrounder.pdf>, prebrano (15.5.2009)

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

Gokhale P. J., Andrews P. W. D. 2006. A prospective on stem cell research. *Seminars in Reproductive Medicine. Stem Cells in Reproductive Medicine*, 24, 5: 289-297

Griffith L. G., Swartz M. A. 2006. Capturing complex 3D tissue physiology *in vitro*. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7: 211–224

Harrison R. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1: 116-118

Hoffman L. M., Carpenter M. K. 2005. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 23: 699 – 708

Hwang N. S., Varghese S., Elisseeff J. 2007 Cartilage tissue engineering: Directed differentiation of embryonic stem cells in three-dimensional hydrogel culture. *Methods in Molecular Biology*, 407: 351-373

Hwang N. S., Kim M. S., Sampattavanich S., Baek J. H., Zhang Z., Elisseeff J. 2006. Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24, 2: 284-291

Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine*, 6: 88–95.

Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J., Gimble J. M., Bunnell B. A. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99, 5: 1285-1297

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 6893: 41–49

- Johnstone B., Hering T. M., Caplan A. I., Goldberg V. M., Yoo J. U. 1998. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental Cell Research*, 238, 1: 265-272
- Kiger A. A., Jones D. L., Shulz C., Rogers M. B., Fuller M.T. 2001. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* 294: 2542–2545
- Kirouac D., Zandstra P. 2008. The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell*, 3, 4: 369-381
- Kondo M., Wagers A.J., Manz M.G. 2003. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Annual Review of Immunology*, 21: 759-806
- Kubo A., Shinozaki K., Shannon J. M., Kouskoff V., Kennedy M., Woo S., Fehling H. J., Keller G. 2004. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 131: 1651–1662
- Lavon N., Yanuka O., Benvenisty N. 2004. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation*, 72, 5: 230–238
- Levenberg S., Huang N. F., Lavik E., Rogers A. B., Itskovitz-Eldor J., Langer R. 2003. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *PNAS*, 100: 12741-12746
- Li Y. J., Chung E. H., Rodriguez R. T., Firpo M. T., Healy K. E. 2006. Hydrogels as artificial matrices for human embryonic stem cell self-renewal. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79A, 1: 1-5
- Liu P., Wakamiya M., Shea M. J., Albrecht U., Behringer R. R., Bradley A. 1999. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature Genetics*, 22, 4: 361-365
- Marolt D., Augst A., Freed L. E., Veparic C., Fajardo R., Patel N., Gray M., Farley M., Kaplan D., Vunjak-Novaković G. 2006. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials*, 27, 36: 6138-6149
- Martin I., Shastri V. P., Padera R. F., Yang J., Mackay A. J., Langer R., Vunjak-Novaković G., Freed L. E. 2001. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 2: 229-235
- Maximow A. 1909. Der lymphozyt als gemeinsame stammzelle der verschiedenen blutelemente in der embryonalen entwicklung und im postfetalen leben der saugtiere. *Folia Haematologica* VIII, 8:125–134

- Meng X., Ichim T. E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K. W., Thebaud B., Riordan N. H. 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5: 57
- Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y. 2003. In vivo and *in vitro* differentiation of myocytes from human bone marrow derived multipotent progenitor cells. *Experimental hematology*, 31, 12: 1323–1330
- Murry C. E., Keller G. 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 132, 4: 661-680
- Nair L. S., Laurencin C. T. 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32, 8-9: 762-798
- Nakanishi M., Kurisaki A., Hayashi Y., Warashina M., Ishiura S., Kusuda-Furue M., Asashima M. 2008. Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23, 1: 114-122
- Ng E. S., Davis R. P., Azzola L., Stanley E. G., Elefanty A. G. 2005. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* 106: 1601–1603
- Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322, 5903: 949-953
- Osgood E. E. 1957. A unifying concept of the etiology of the leukemias, lymphomas, and cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 18, 2: 155-166
- Parson A. B. 2008. Stem cell biotech: seeking a piece of the action. *Cell*, 133, 4: 511-513
- Price J., Thurlow L. 1988. Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development*, 104, 3: 473-482
- Radisic M., Park H., Gerecht-Nir S., Cannizzaro C., Langer R., Vunjak-Novaković G. 2007. Biomimetic approach to cardiac tissue engineering. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 362: 1357–1368
- Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie C. M. 2001. Purification and ex-vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98, 9: 2615–2625
- Reynolds B. A., Weiss S. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 5052:1707–1710

- Sahoo S., Chung C., Khetan S., Burdick J. A. 2008. Hydrolytically degradable hyaluronic acid hydrogels with controlled temporal structures. *Biomacromolecules*, 9, 4: 1088–1092
- Shanti R., Li W., Nesti L., Wang X., Tuan R. 2007. Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 65, 8: 1640-1647
- Shi Y., Hou L., Tang F., Jiang W., Wang P., Ding M., Deng H. 2005. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells*, 23, 5: 656–662
- Shinoka T., Ma P. X., Shum-Tim D. 1996. Tissue engineered heart valves. *Circulation*, 94: 164-168
- Smith J. R., Vallier L., Lupo G., Alexander M., Harris W. A., Pedersen R. A. 2008. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Developmental Biology*, 313: 107–117
- Strbad M., Rožman P. 2005. Uporaba matičnih celic v medicini. *Proteus*, 67, 8: 340-348
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 5: 861-72
- Thomas E. D., Lochte H. L., Lu W. C., Ferrebee J. W. 1957. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 257: 491-496
- 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
- Ungrin M. D., Joshi C., Nica A., Bauwens C., Zandstra P. W. 2008. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS ONE*, 3, 2: e1565
- Vacanti J. P., Langer R. 1999. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*, 354: 32-34
- Vacanti C. A., Langer R., Schloo B., Vacanti J. P. 1991. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 88, 5: 753-759
- Vunjak-Novaković G., Meinel L., Altman G., Kaplan D. 2005. Bioreactor cultivation of osteochondral grafts. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 8, 3: 209-218

- Weaver, V.M., Petersen, O.W., Wang, F., Larabell C. A., Briand P., Damsky C., Bissell M. J. 1997. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in threedimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies. *The Journal of Cell Biology*, 137: 231–245
- Weitzer G. 2006. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies: an *in vitro* model of eutherian pregastrulation development and early gastrulation. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 174: 21–51
- Xie T., Spradling A.C. 2000. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 290: 328–330
- Xu C., Rosler E., Jiang J., Lebkowski J. S., Gold J. D., O'Sullivan C., Delavan-Boorsma K., Mok M., Bronstein A., Carpenter M. K. 2005. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells*, 23:315–323
- Xu R. H., Chen X., Li D. S. 2002. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nature Biotechnology*, 20, 12:1261–1264
- Yoon B. S., Yoo S. J., Lee J. E., You S., Lee H. T. 2006. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation*, 74: 149–159
- Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I. I., Thomson J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 5858: 1917–1920
- Zipori D. 2005. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*, 23, 6: 719–726
- Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7: 211–228
- Zwaka T. P., Thomson J. A. 2003. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 21:319–321

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Miomirju Kneževiću za mentorstvo, pomoč in svetovanje pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem je mentorjevim sodelavcem na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, ki so mi omogočili predhodno uvajanje v delo v celičnem laboratoriju.

Zahvaljujem se dr. Gordani Vunjak-Novaković in vsem njenim sodelavcem, ki so me sprejeli v njihov laboratorij in poskrbeli, da sem se v njem dobro počutil.

Zahvaljujem se somentorici in delovni mentorici dr. Darji Marolt za potrežljivost, učenje laboratorijskega dela in za neposredno pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Mislim, da ji je uspelo veliko svojega znanja prenesti name.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Petru Dovču za strokovni pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se vsem, ki so kakorkoli drugače pripomogli k nastanku tega diplomskega dela.

Na koncu bi se rad zahvalil tudi staršem in punci, ki so mi materialno in moralno stali ob strani pri izdelavi diplomske naloge. To delo posvečam njim.