

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Daliborka DUŠANIĆ

**SPREMLJANJE FENOTIPSKIH LASTNOSTI ČLOVEŠKIH
HRUSTANČNIH CELIC MED GOJENJEM V
ALGINAT/AGAROZNEM GELU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHENOTYPE CHARACTERISTICS OF HUMAN CHONDROCYTE
CELLS CULTIVATED IN ALGINATE/AGAROSE GEL**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključno delo univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratorijih Zavoda RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani in podjetju Educell d.o.o.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorico dr. Elvira Maličev, za recenzentko prof. dr. Mojca Narat.

Mentorica: prof. dr. Kristina SEPČIČ

Somentorica: dr. Elvira MALIČEV

Recenzentka: prof. dr. Mojca NARAT

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor NEKREP
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Elvira MALIČEV
Educell d.o.o.

Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Daliborka DUŠANIĆ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	576.35 : 611.72 : 615.36 (043)=863
KG	hrustanec/hondrociti/celične kulture/alginat/agarozni gel/kolagen II/agrekan/RT-PCR/fluorescenčna mikroskopija/dimetiltiazol-difeniltetrazol bromid in tiazolilsko modrilo (MTT)/tkivno inženirstvo
AV	DUŠANIĆ, Daliborka
SA	SEPČIĆ, Kristina (mentorica) / MALIČEV, Elvira (somentorica) / NARAT, Mojca (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	SPREMLJANJE FENOTIPSKIH LASTNOSTI ČLOVEŠKIH HRUSTANČNIH CELIC MED GOJENJEM V ALGINAT/AGAROZNEM GELU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 52 str., 18 sl., 3 pril., 38 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V diplomski nalogi smo želeli določiti optimalno koncentracijo človeških hrustančnih celic v tridimenzionalni kulturi iz celic in mešanice alginata in agaroze, ki omogoča najustreznejše izražanje genov, specifičnih za hialini sklepni hrustanec. Hondrocite petih bolnikov smo izolirali z mehansko in encimsko razgradnjo iz biopsijskega vzorca tkiva. Izolirane hondrocite smo gojili v enoslojni kulturi do prve pasaže. Po encimski obdelavi s tripsinom smo celice nasadili v enoslojno kulturo druge pasaže ter v treh različnih koncentracijah ($1 \times 10^6/\text{ml}$, $5 \times 10^6/\text{ml}$ in $10 \times 10^6/\text{ml}$) v diske iz mešanice alginata in agaroze. Hondrocite smo gojili 14 dni v gojilnem mediju z dodatkom 15% humanega seruma. Med gojenjem smo spremljali spremembo v morfologiji hondrocitov. Rezine diskov smo barvali z dvema metodama za določanje živosti celic: z barvilom dimetiltiazol-difeniltetrazol bromid in tiazolilsko modrilo (MTT) in s kombinacijo fluorescenčnih barvil (fluorescein diacetat in propidijev jodid). Živost celic smo določili kvalitativno s pomočjo invertnega oziroma fluorescenčnega mikroskopa. Po gojenju hondrocitov smo analizirali izražanje genov, specifičnih za hialini hrustanec (<i>col II</i> , <i>agr</i>) in vezivni hrustanec (<i>col I</i> , <i>ver</i>). Iz celic smo izolirali celotno RNA, jo prepisali v cDNA in analizirali izražanje genov z metodo verižnega pomnoževanja v realnem času (RT-PCR). Rezultate smo statistično vrednotili in določili signifikantnost razlik v izražanju genov. Morfologija hondrocitov se je med gojenjem v enoslojnih kulturah spremenila iz okrogle v fibroblastno, kar kaže na proces dediferenciacije. Po nasaditvi dediferenciranih celic v tridimenzionalno kulturo je prišlo do spremembe nazaj v sferično morfologijo, kar kaže na proces rediferenciacije. Živost celic v diskih iz gela je bila visoka ne glede na koncentracijo celic v disku. Dokazali smo statistično značilno razliko med izražanjem genov v enoslojni in tridimenzionalni kulturi (rediferenciacijo hondrocitov v tridimenzionalnem okolju), ne pa tudi med posameznimi koncentracijami hondrocitov v diskih iz alginat/agaroznega gela.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 576.35 : 611.72 : 615.36 (043)=863
CX cartilage/chondrocytes/cell cultures/alginate/agarose gel/collagen II/agrecan/RT-PCR/fluorescent microscopy/MTT/tissue engineering
AU DUŠANIĆ, Daliborka
AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor) / MALIČEV, Elvira (co-advisor) / NARAT, Mojca (reviewer)
PP SI-Ljubljana, Večna pot 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI PHENOTYPE CHARACTERISTICS OF HUMAN CHONDROCYTE CELLS CULTIVATED IN ALGINATE/AGAROSE GEL
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 52 p., 18 fig., 3 ann., 38 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of this graduation thesis was to determine the optimal concentration of chondrocytes in chondrocyte-seeded gel constructs that would allow the occurrence and maintaining of phenotype most similar to the native articular cartilage tissue. After the mechanical and enzymatic isolation of chondrocytes from the biopsy specimens of five different patients, cells were cultured in monolayer cultures till confluency. The cultures were treated with trypsin, and gel (alginate-agarose) constructs were prepared by seeding 1×10^6 cells/ml, 5×10^6 cells/ml, or 10×10^6 cells/ml in the gel. Second passage monolayer cultures were prepared for comparison. During the cultivation, we monitored the changes in chondrocyte morphology in each culturing conditions. After cultivating the cultures for 14 days in 15 % serum media, the viability of chondrocytes was determined qualitatively by using two methods: by staining thin slices of hydrogel with MTT or with fluorescent dyes fluorescein diacetate and propidium iodide, and by examining the stained slices under light and fluorescent microscope, respectively. The expression of specific genes after the cultivation has also been studied: chondrocyte-specific genes *col II* and *agr* (coding for collagen II and aggrecan), and fibroblast-specific genes *col I* and *ver* (coding for collagen I and versican). RNA was isolated from sampled cells, transcribed into cDNA, and analysed by RT-PCR method. The statistical analysis focused on col II/col I and agr/ver indexes. Statistical significance was also determined. The morphology of chondrocytes changed during monolayer culturing from spherical to fibroblastic, pointing to dedifferentiation. In gel constructs, the morphology changed back to spherical, which is a sign of redifferentiation. Cell viability in hydrogel constructs was good for all seeding concentrations. We proved a statistically significant difference between the expression of tested genes in monolayer and three-dimensional cultures, proving redifferentiation of chondrocytes in hydrogels. We failed to determine the statistically significant differences in the expression of tested genes between tested concentrations of chondrocytes seeded in gel constructs.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN NALOGE	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HRUSTANČNO TKIVO	3
2.1.1 Biološke lastnosti in razvoj hrustančnega tkiva	3
2.1.2 Hondrociti	4
2.1.3 Izvencelični matriks sklepnega hrustančnega tkiva	4
2.1.3.1 Kolageni	4
2.1.3.2 Proteoglikani	5
2.1.3.3 Glikoproteini	5
2.1.3.4 Voda	5
2.1.4 Biološka spremenljivost	6
2.2 POSKUSNI MODELI ZA PREUČEVANJE HRUSTANČNEGA TKIVA	7
2.2.1 Primarna kultura hondrocitov	7
2.2.2 Klonske celične linije	7
2.2.3 Celične linije z izzvano nesmrtnostjo	7
2.2.4 Kulture organov	8
2.3 METODE GOJENJA HONDROCITOV	8
2.3.1 Enoslojna kultura	8
2.3.2 Tridimenzionalne kulture	8
2.4 METODE ZA ANALIZO IZRAŽANJA GENOV, KI KODIRAJO KOMPONENTE IZVENCELIČNEGA MATRIKSA	10

2.5	TKIVNO INŽENIRSTVO HRUSTANČNEGA TKIVA	12
2.5.1	Strategije zdravljenja hrustančnega tkiva	12
2.5.1.1	Avtologna implantacija hondrocitov	12
2.5.1.2	Z matriksom inducirana avtologna implantacija hondrocitov	13
2.5.2	Vloga in lastnosti nosilcev pri pripravi tkivnih konstruktov iz hondrocitov	13
3	MATERIAL IN METODE	14
3.1	POTEK POSKUSOV	14
3.2	POSTOPEK GOJENJA CELIČNIH KULTUR	15
3.2.1	Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema	15
3.2.1.1	Kemikalije	15
3.2.1.2	Droben laboratorijski material	15
3.2.1.3	Laboratorijska oprema	16
3.2.2	Priprava primarne kulture hondrocitov iz vzorca hrustančnega tkiva	16
3.2.2.1	Izolacija hondrocitov	16
3.2.2.2	Priprava primarne kulture	16
3.2.3	Priprava primarne kulture hondrocitov iz zamrznjenih vzorcev primarne kulture	17
3.2.3.1	Odmrzovanje vzorca	17
3.2.3.2	Priprava primarne kulture	17
3.2.4	Nasaditev hondrocitov v prvo pasažo	18
3.2.4.1	Tripsinizacija	18
3.2.4.2	Štetje celic s hemocitometrom	18
3.2.4.3	Nasaditev celic v prvo pasažo	18
3.2.4.4	Shranjevanje celic v tekočem dušiku	19
3.2.5	Nasaditev celic v drugo pasažo in diske iz gela	19
3.2.6	Dohranjevanje celičnih kultur hondrocitov	20
3.2.7	Odvzem vzorcev za nadaljnje analize	20
3.3	KVALITATIVNO DOLOČANJE ŽIVOSTI HONDROCITOV V DISKIH IZ GELA	21
3.3.1	Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema	21
3.3.1.1	Kemikalije	21
3.3.1.2	Droben laboratorijski material	21
3.3.1.3	Laboratorijska oprema	21
3.3.2	Barvanje rezin gela z barvilom MTT	21
3.3.3	Barvanje rezin gela s fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom	22
3.3.4	Fotografiranje	22
3.4	KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA SPECIFIČNIH GENOV V VZORCIH ENOSLOJNIH IN TRIDIMENZIONALNIH KULTUR	23

3.4.1	Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema	23
3.4.1.1	Kemikalije	23
3.4.1.2	Droben laboratorijski material	23
3.4.1.3	Laboratorijska oprema	23
3.4.2	Izolacija RNA	24
3.4.3	Prepis RNA v cDNA	24
3.4.4	Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času (RT-PCR)	25
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	26
4	REZULTATI	27
4.1	MORFOLOGIJA HONDROCITOV GOJENIH V ENOSLOJNI KULTURI	27
4.2	ŽIVOST CELIC ZNOTRAJ GELA PO 14-IH DNEH GOJENJA	29
4.3	IZRAŽANJE GENOV SPECIFIČNIH ZA SKLEPNO HRUSTANČNO TKIVO – DEDIFERENCIACIJA IN REDIFERENCIACIJA HONDROCITOV	33
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1	ŽIVOST CELIC V DISKIH IZ GELA	42
5.2	FENOTIPSE LASTNOSTI HONDROCITOV, GOJENIH V ENOSLOJNIH IN TRIDIMENZIONALNIH KULTURAH	43
5.3	SKLEPI	46
6	POVZETEK	47
7	VIRI	48
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1	Hialini sklepni hrustanec: položaj v sklepu, gradbene enote izvenceličnega matriksa in njihova medsebojna povezanost v ogrodje (Hollister, 2005).	6
Slika 2	Grafično predstavljen rezultat verižnega pomnoževanja v realnem času (RT-PCR).	11
Slika 3	Fotografije konfluentnih primarnih kultur hondrocitov posnetih pri različnih povečavah.	27
Slika 4	Fotografije kultur hondrocitov, izoliranih iz vzorca hrustanca bolnika KL, namnoženih v enoslojni kulturi in potem nasajenih pri različnih koncentracijah v diske iz gela.	28
Slika 5	Fotografije rezin diskov iz gela, pripravljenih iz hondrocitov bolnika DS po barvanju z barvilom MTT.	29
Slika 6	Fotografije rezin diskov iz gela po barvanju s fluorescenčnimi barvili fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom.	30
Slika 7	Nivo izražanja gena <i>col II</i> v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.	34
Slika 8	Nivo izražanja gena <i>col I</i> v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.	34
Slika 9	Nivo izražanja gena <i>agr</i> v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.	35
Slika 10	Nivo izražanja gena <i>ver</i> v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.	35
Slika 11	Srednja vrednost (mediana) nivoja izražanja gena <i>col II</i> v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.	36
Slika 12	Srednja vrednost (mediana) nivoja izražanja gena <i>col I</i> v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.	37
Slika 13	Srednja vrednost (mediana) nivoja izražanja gena <i>agr</i> v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.	37
Slika 14	Srednja vrednost (mediana) nivoja izražanja gena <i>ver</i> v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.	38
Slika 15	Diferenciacijski indeks <i>agr/ver</i> , izračunan za vzorce enoslojnih kultur prve in druge pasaže ter diske z različno koncentracijo celic.	38
Slika 16	Diferenciacijski indeks <i>agr/ver</i> , izračunan za vzorce enoslojnih kultur prve in druge pasaže ter diske z različno koncentracijo celic.	39
Slika 17	Srednje vrednosti (mediane) diferenciacijskih indeksov kol II/kol I pri vzorcih enoslojnih kultur prve in druge pasaže ter diskov z različno koncentracijo celic.	40
Slika 18	Srednje vrednosti (mediane) diferenciacijskih indeksov <i>agr/ver</i> pri vzorcih enoslojnih kultur prve in druge pasaže ter diskov z različno koncentracijo celic.	40

KAZALO PRILOG

- Priloga A** Normalizirane vrednosti izražanja izbranih genov pri petih vzorcih in različnih eksperimentalnih pogojih.
- Priloga B** Srednje vrednosti (mediane) nivejev izražanja izbranih genov pri petih vzorcih in različnih eksperimentalnih pogojih.
- Priloga C** Rezultati statistične analize podatkov, o izražanju izbranih genov – Friedmanov in Wilcoxonov test

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

abs	absolutna vrednost števila
cDNA	komplementarna DNA, ki nastane z obratno transkripcijo iz mRNA
Ct	mejni cikel pri RT-PCR
dATP	deoksiadenin-trifosfat
dCTP	deoksicitozin-trifosfat
DEPC	dietilpirokarbonat
dGTP	deoksigvanin-trifosfat
D-MEM	Dulbeccova modifikacija Eaglovega medija
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deosinukleotid-trifosfat
dTTP	deoksitimin-trifosfat
EDTA	etilendiaminotetraoetna kislina
F12	Hamov medij za celične kulture
g	enota pospeška pri centrifugiranju, težni pospešek
HBSS	Hanksova ozmolarna raztopina soli
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MTT	dimetiltiazol-difeniltetrazol bromid in tiazolilsko modrilo
N	skupno število
n	povprečno število
nm	nanometer
PBS	slani fosfatni pufer
RNA	ribonukleinska kislina
RT-PCR	verižna reakcija pomnoževanja v realnem času
SD	standardna deviacija (odklon)
SDS – PAGE	natrijeva dodecilsulfatna poliakrilamidna gelska elektroforeza
TGF-β	transformirajoči rastni faktor beta

SLOVARČEK

agrekan	poglavitni proteoglikan sklepnega hrustančnega tkiva
avtologna implantacija hondrocitov	postopek zdravljenja sklepnih poškodb bolnika z njemu lastnimi hrustančnimi celicami, gojenimi <i>in vitro</i>
celična kultura dediferenciacija	metoda gojenja evkariontskih celic <i>in vitro</i> proces spreminjanja fenotipa celice v manj tkivno specifično obliko
enoslojna kultura	metoda gojenja celic s sposobnostjo pritrditve na podlago v celičnih kulturah v gojilnih posodah
fenotip	lastnosti organizma, ki so določene z zapisi v genomu in okoljskimi dejavniki med razvojem organizma – strukturne in funkcijske lastnosti organizma, ki jih lahko opazimo
hondrocit hrustanec	osnovna celična enota hrustančnega tkiva specifična oblika tkiva, sestavljena iz hondrocitov in obilnega izvenceličnega matriksa
kolagen	poglavitna proteinska sestavna enota izvenceličnega matriksa hondrocitov
konfluenca	pojavnost celic v enoslojni kulturi prerastejo dno gojilne posode in so v stiku ena z drugo
mezenhim	embrionalno tkivo, iz katerega se med ostalim razvije tudi hrustančno tkivo
perihondrij	plast gostega vezivnega tkiva, ki obdaja hrustančno tkivo, ga loči od okoljskega tkiva in ščiti pred zunanjimi vplivi
reverzna transkripcija	postopek prepisa RNA v cDNA s pomočjo encima reverzna transkriptaza
tkivno inženirstvo	<i>in vitro</i> priprava pripravka iz zdravih celic in nosilca, ki poskuša nadomestiti poškodovano tkivo z zdravimi celicami
tripsinizacija	postopek odlepljanja celic enoslojne kulture z dna gojilne posode s pomočjo encima tripsin
tridimenzionalna kultura	metoda gojenja evkariontskih celic v različnih nosilnih strukturah, ki omogočajo rast v treh dimenzijah prostora
verzikan	poglavitna komponenta izvenceličnega matriksa vezivnega hrustančnega tkiva
vitalno barvanje	postopek diferenciacijskega barvanja celic s pomočjo barvil, ki pobarvajo ali žive ali mrtve celice in omogočajo njihovo ločevanje

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Hialini hrustanec je specializirana oblika vezivnega tkiva, ki je sestavljen iz manjšega števila hondrocitov in obilnega izvenceličnega matriksa. Matriks deluje kot okolje za difuzijo hranil v tkivo in je odgovoren za biomehanske lastnosti hrustančnega tkiva. Posebnost hrustančnega tkiva je zelo počasna rast in zmanjšana sposobnost okrevanja po mehanski poškodbi. Specifičen pojav je dediferenciacija tkiva – sprememba fenotipa iz hondrocitnega v fibroblastnega in tvorba t.i. fibroznega tkiva na mestu poškodbe. Fibrozno tkivo nudi manjšo biomehansko podporo sklepu in hitro razpade, posledica je nastanek artritisa. Možno rešitev za pomoč pri zdravljenju poškodb hrustanca predstavlja tkivno inženirstvo. Osnovna ideja tkivnega inženirstva je v pogojih *in vitro* pripraviti pripravek iz zdravih celic in nosilca. Po vsaditvi takega pripravka na poškodovano mesto se tkivo povrne v zdrav fenotip in funkcionalno obliko.

Tudi pri tkivnem inženirstvu sklepnega hrustančnega tkiva se srečamo s problemom dediferenciacije hondrocitov. Za namnožitev hrustančnih celic do ustreznega števila, potrebnega za vnos v bolnika, se uporablja postopek gojenja celic v celičnih kulturah, najpogosteje v obliki enosloja. Prednost gojenja celic v enosloju, v primerjavi z gojenjem v tridimenzionalnih sistemih in peletnih kulturah, je hitra rast in preprostost postopkov. Slabost pa je hitra dediferenciacija, to je izguba specifičnega fenotipa.

Upoštevajoč tridimenzionalnost naravnega okolja hondrocitov se razvijajo tudi metode gojenja celic v tridimenzionalnih nosilnih strukturah, ki jih pripravimo iz različnih polimerov. Njihova prednost je podobnost naravnemu okolju, ki omogoča izražanje ustrežnejšega fenotipa. Slabosti pa so počasna rast celic in zahtevnejši postopki priprave ter gojenja. Postopki so še v eksperimentalni fazi razvoja in niso natančno definirani.

V diplomski nalogi smo preučevali spremembo fenotipskih lastnosti človeških hondrocitov po presaditvi iz enoslojne kulture v gel, pripravljen iz alginata in agaroze. Naloga je del obsežnejšega znanstveno-raziskovalnega projekta, v katerem želimo z nadaljnjimi poskusi optimizirati pripravo tkivnega nadomestka za zdravljenje poškodovanega hrustančnega tkiva.

1.2 NAMEN NALOGE

V diplomski nalogi smo iz celic sklepnega hrustanca petih bolnikov pripravili celične kulture v obliki enosloja. Potem smo celice v treh različnih koncentracijah nasadili v gel iz alginata in agaroze. Namen naloge je bil ugotoviti stopnjo rediferenciacije predhodno dediferenciranih hondrocitov in določiti koncentracijo hondrocitov v gelu, pri kateri je fenotip najbolj podoben fenotipu hialinega sklepnega hrustanca.

Želeli smo:

- spremljati živost celic znotraj gela po 14-ih dneh gojenja,
- ugotoviti spremembo izražanja genov, specifičnih za hialini sklepni hrustanec med gojenjem hondrocitov v dveh pasajah enoslojne celične kulture,
- ugotoviti spremembo izražanja genov, specifičnih za hialini sklepni hrustanec po 14-dnevnem gojenju treh različnih koncentracij hondrocitov v gelnem konstrukt,
- kvantitativno ovrednotiti izražanje izbranih genov,
- ugotoviti razlike med izražanjem specifičnih genov med enoslojnimi in tridimenzionalnimi kulturami v gelu,
- ugotoviti razlike med izražanjem specifičnih genov med hondrociti, gojenimi pri različnih koncentracijah v gelnem pripravku.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakovali smo, da bo gojenje hondrocitov v tridimenzionalnem okolju ustavilo proces dediferenciacije, do katerega pride tekom gojenja v enoslojni kulturi, ter do določene stopnje povrnilo celicam lastnosti, značilne za hialini fenotip hondrocitov. Pričakovali smo torej povečano stopnjo izražanja za hialini sklepni hrustanec specifičnih genov in zmanjšano stopnjo izražanja nespecifičnih genov pri hondrocitih, gojenih v diskah iz gela. Pričakovali smo nižjo živost celic v osrednjem delu diska zaradi slabšega dostopa do hranilnih snovi in kisika. Ker je koncentracija hondrocitov v hrustančnem tkivu okrog $14 \times 10^6/\text{ml}$, smo pričakovali, da bo najvišja izmed testiranih koncentracij celic v gelu najbolj ustrežna za izražanje specifičnih genov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 HRUSTANČNO TKIVO

2.1.1 Biološke lastnosti in razvoj hrustančnega tkiva

Hrustančno tkivo je posebna oblika vezivnega tkiva, s specifičnimi biomehanskimi lastnostmi. Sestavljeno je iz hondrocitov in obilnega izvenceličnega matriksa, ki ga izločajo hondrociti. Biomehanske lastnosti hrustančnega tkiva so posledica sestave in razporeditve molekul izvenceličnega matriksa ter vsebnosti vode in elektrolitov (Martin in sod., 2001).

Glede na prevladujoče molekule izvenceličnega matriksa razlikujemo tri tipe hrustančnega tkiva. Vezivni hrustanec se nahaja v medvretenčnih ploščicah, sramni zrasti in na mestih, kjer se ligamenti ali kite povezujejo s kostmi. Elastični hrustanec se nahaja v uhlju, stenah različnih telesnih kanalov (slušni kanal, Evstahijeva cev, grlo) in v epiglotisu. Tretja oblika hrustančnega tkiva je sklepni hrustanec (Slika 1), ki podpira vse večje sklepe, predstavlja osnovno tkivo za razvoj embrionalnih kosti, nahaja pa se tudi v nosu, trahejah in rebrih. Osnovna naloga hrustančnega tkiva je opora mehkeemu tkivu in preprečevanje deformacije drugih tkiv kot posledica mehanske obremenitve (Hollister, 2005).

Hondrociti se v hrustančnem tkivu nahajajo v skupinah več celic, ki ležijo v lakunah in tvorijo osnovno enoto tkiva – hondron. Področje, ki obdaja posamezne hondrone, je sestavljeno iz izvenceličnega matriksa, ki v neposrednem stiku s hondrociti vsebuje največ proteoglikanov. Pravimo mu pericelularni matriks. Pericelularni matriks obdaja teritorialni matriks, ki je manj bogat s proteoglikani, najmanj proteoglikanov pa vsebuje interteritorialni matriks, ki je najbolj oddaljen od hondrocitov. Hondrociti se tudi na višji organizacijski ravni znotraj zrelega sklepnega hrustanca razporedijo v cone z različnimi funkcijami in lastnostmi. Razlikujemo površinsko, osrednjo, globoko in mineralizirano cono. Vsebnost proteoglikanov je najvišja v osrednji coni, vsebnost kolagenov pa v površinski. Posledično je tudi odpornost posameznih con na mehanske obremenitve različna (Lin in sod., 2006; Darling in Athanasiou, 2004).

Hondrociti se razvijajo iz mezenhimskih celic v zgodnjih fazah razvoja zarodka. Razvoj poteka v dveh fazah, morfogenetski fazi in fazi diferenciacije. Tekom morfogenetske faze razvoja se celice zbirajo na mestih hondrogeneze. Sledi namnožitev celic v gosto celično maso in diferenciacija celic, ki začnejo izločati komponente izvenceličnega matriksa. Z diferenciacijo celic v zrele hondrocite se povečuje količina izločenega izvenceličnega matriksa. Iz mezenhima, ki obdaja hrustančni primordij, se razvije tudi perihondrij – plast gostega vezivnega tkiva, ki obdaja hrustančno tkivo, ga loči od okoljskega tkiva in ščiti. Dodatna vloga perihondrija, ki je dobro prekrvavljen in oživčen, je tudi prehranjevanje neprekrvavljenega in neoživčenega hrustančnega tkiva. Hranila prosto difundirajo iz perihondrija do hondrocitov skozi z vodo bogat izvencelični matriks. Notranja plast primordija je zarodna plast, ki lahko z diferenciacijo ustvari nove hrustančne celice in omogoča rast. V razvoj in zorenje hondrocitov je vpleteno veliko število rastnih faktorjev:

proteini iz družine TGF- β , morfogogenetski proteini kosti, hrustančni morfogogenetski proteini, fibroblastni rastni faktorji in inzulinu podoben rastni faktor. Njihova vloga ni natančno pojasnjena (Lin in sod., 2006).

2.1.2 Hondrociti

Zreli človeški hondrociti so večinoma sferične oblike, povprečnega premera 13 μm . Predstavljajo le 5–10 % celotnega volumna hrustančnega tkiva, so pa izjemno pomembni za vzdrževanje stabilnega izvenceličnega matriksa. Jedro hondrocitov je okrogle ali elipsoidne oblike. Ker je osnovna naloga hondrocitov izločanje izvenceličnega matriksa, je dobro razvit Golgijev aparat, ki se v fazi sinteze izvenceličnega matriksa še dodatno poveča. V citoplazmi se nahajajo podolgovati mitohondriji, včasih tudi lipidne kapljice in glikogen. Hondrociti se nahajajo v lakunah obilnega izvenceličnega matriksa in ne tvorijo celičnih povezav, le interakcije z matriksom (Lin in sod., 2006).

2.1.3 Izvencelični matriks hialinega sklepnega hrustančnega tkiva

Hondrociti sintetizirajo in razgrajujejo izvencelični matriks – prevladujočo strukturo hrustančnega tkiva. Osnovne sestavine matriksa so netopne proteinske fibrile, topni polimeri in voda. Voda predstavlja največji delež sklepnega hrustanca, od 65 % do 85 %. Netopne proteinske fibrile so večinoma zastopane v obliki kolagena, v elastičnem hrustancu je prisoten tudi elastin. Najbolj zastopan topni polimer je proteoglikan agrekan, prisotni so pa tudi drugi proteoglikani, glikozaminoglikani in glikoproteini (Hollister, 2005).

Izvencelični matriks je zelo pomemben za pravilno delovanje in organizacijo hrustančnega tkiva. Matriks vpliva na obliko in fenotip hondrocitov, biomehanske lastnosti tkiva, predstavlja medij za difuzijo hranil, odpadnih produktov in regulatornih molekul. Ker hondrociti matriks tudi razgrajujejo, predstavljajo razgradni produkti substrat za nastanek novih molekul. Vsaka komponenta izvenceličnega matriksa ima določeno vlogo v delovanju celotnega matriksa. Kolagenske fibrile so odgovorne za oblikovanje in raztegljivost tkiva, agrekan za odpornost proti mehanskim obremenitvam, ostale molekule za strukturno organizacijo, pritrditev tkiva in diferenciacijo (Hollister, 2005).

2.1.3.1 Kolageni

Kolagen je najbolj zastopan protein v hrustančnem tkivu, predstavlja 10–20 % celotnega tkiva. V zdravem sklepnem hrustancu je največ kolagena II, ki tvori fibrile, dolge nekaj mikrometrov. V povezavi s kolagenoma IX in XI gradi ogrodje, na katero se povezujejo molekule agrekana, manjši proteoglikani in številni proteini, ki se izločajo v različnih fazah rasti in razvoja. Različni tipi hrustančnega tkiva vsebujejo kolagene v različnih razmerjih. V vezivnem hrustančnem tkivu prevladuje kolagen I, v elastičnem je dokazana prisotnost kolagena II, kolagena I in kolagena X (Marlovits in sod., 2004; Hollister, 2005).

Fibrile kolagena so zgrajene iz mikrofibrilarnih podenot, ki nastanejo s polimerizacijo osnovnih gradbenih enot kolagena – molekul tropokolagena. Molekula tropokolagena je sestavljena iz treh polipeptidnih verig, ki so vsaka posebej ovite okrog svoje osi, vse tri pa se ovijajo druga okrog druge in tako tvorijo trojni heliks (Slika 1). Med seboj so povezane z vodikovimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami. V sestavi polipeptidnih verig prevladujejo tri aminokisliline, glicin, prolin in hidroksiprolin (Nelson in Cox, 2005).

2.1.3.2 Proteoglikani

Druga prevladujoča strukturna komponenta sklepnega hrustančnega tkiva so molekule proteoglikanov, ki predstavljajo 5–10 % tkiva. Proteoglikani so sestavljeni iz proteinske molekule, na katero so kovalentno vezane verige glikozaminoglikanov. Ogljikohidratni delež makromolekule predstavlja 80–90 % celotne teže. V hrustančnem matriksu so prisotni naslednji glikozaminoglikani: hialuronska kislina, hondroitin sulfat in keratin sulfat. Posebnost hialuronske kisline je, da se ne veže na osrednji protein in ne vsebuje sulfatnih skupin (Nelson in Cox, 2005).

Najbolj zastopan proteoglikan v hialinem hrustančnem tkivu je agrekan. Agrekan je makromolekula, sestavljena iz osrednje proteinske molekule, na katero je vezano več kot sto verig hondroitin sulfata in približno trideset verig keratin sulfata. Makromolekule agrekana se preko molekul hialuronske kisline in veznih proteinov nekovalentno povezujejo v velike proteoglikanske skupke, ki skupaj z ostalimi proteoglikani, glikozaminoglikani in glikoproteini zapolnjujejo ogrodje (Slika 1), sestavljeno iz kolagenskih fibril (Lin in sod., 2006). Hondrociti sintetizirajo tudi druge proteoglikane, vendar v manjših količinah: sindekane, glipikan, dekorin, biglikan, fibromodulin, lumikan, epifikan in perlekan. Številne negativno nabite skupine proteoglikanov določajo hidrofilno naravo makromolekul. Posledice teh skupin so vezava velike količine vode in elektrostatske interakcije s kolagenskimi fibrilami (Knudson C. B. in Knudson W., 2004).

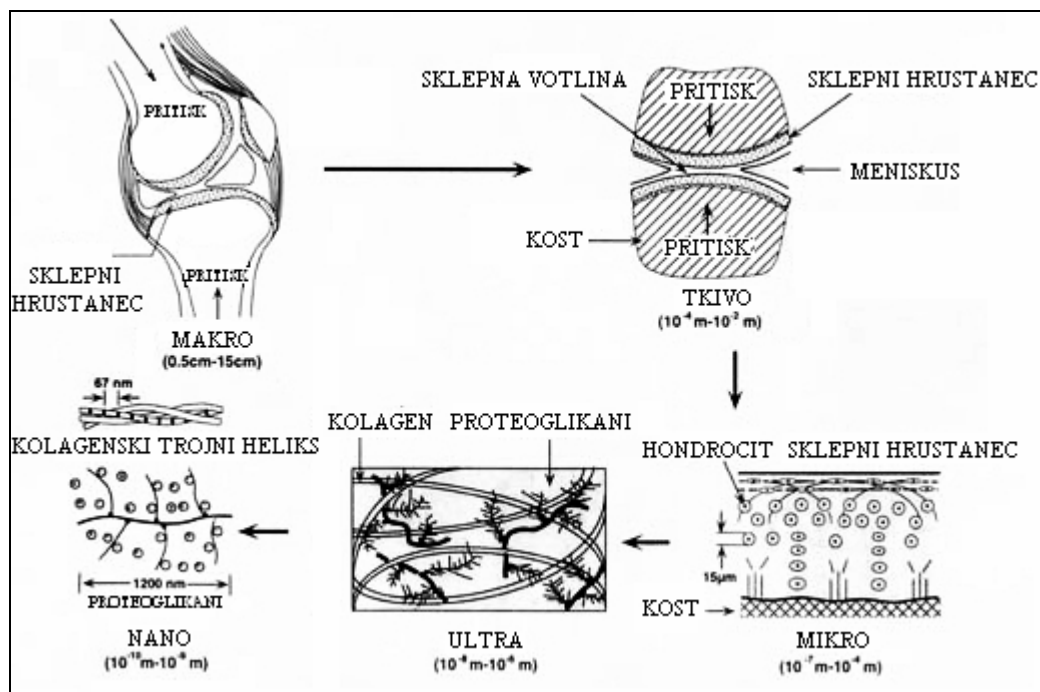
2.1.3.3 Glikoproteini

Manjši delež izvenceličnega matriksa hrustančnega tkiva predstavljajo tudi molekule glikoproteinov. Glikoproteini so globularni proteini, na katere so kovalentno vezane monosaharidne enote. Najpomembnejši strukturni glikoprotein hrustančnega tkiva je hondronektin. Njegova vloga je povezovanje molekul glikozaminoglikanov na fibrile kolagena II (Junqueira in Carneiro, 2003).

2.1.3.4 Voda

Voda, vezana na polianionske makromolekule izvenceličnega matriksa, predstavlja največji delež matriksa – od 65 % do 85 %. Količino vode določajo trije dejavniki: koncentracija proteoglikanov v matriksu, organizacija kolagenskega ogrodja ter trdnost in moč ogrodja. Voda je medij za difuzijo hranil, plinov in ionov, najpomembnejša vloga pa je vzdrževanje biomehanskih lastnosti hrustančnega tkiva oz. njegova odpornost pred

mehanskimi obremenitvami. V primeru razpada kolagenskega ogrodja, količina vode v hrustančnem tkivu narašča, ker ima voda dostop do večjega števila negativnih ionov. Posledica so bistveno spremenjene biomehanske lastnosti tkiva (Hollister, 2005).



Slika 1: Hialini sklepni hrustanec: položaj v sklepu, gradbene enote izvenseličnega matriksa in njihova medsebojna povezanost v ogrodje (Hollister, 2005).

2.1.4 Biološka spremenljivost

Na izražanje genov, ki so vpleteni v regulacijo sinteze komponent izvenseličnega matriksa, njegovo sestavo in izločanje, vplivajo številni faktorji. Kaže, da je med pomembnejšimi faktorji faza celičnega cikla hondrocitov, ker sinteza komponent poteka v interfazi (Strehl in sod., 2002). Določeni avtorji poročajo tudi o pomembnosti biološke spremenljivosti med posamezniki – različni osebki izločajo namreč različne količine specifičnih komponent izvenseličnega matriksa, kar pomeni tudi različno nagnjenost k dediferenciaciji (Gründer in sod., 2004; Tallheden in sod., 2004). Hondrociti starejših ljudi izločajo manjše in manj homogene molekule agrekana in manj funkcionalne proteine, ki medsebojno povezujejo posamezne komponente izvenseličnega matriksa. Spodobnost hondrocitov, da izločajo izvenselični matriks in se podvajajo, tudi sovpada s starostjo, saj se hrustančno tkivo po končni diferenciaciji deli zelo malo in počasi ali se sploh več ne deli. Upada tudi odzivnost na anabolične mehanske dražljaje in rastne faktorje (Giannoni in Cancedda, 2006). Na uspešnost gojenja hondrocitov v pogojih *in vitro* torej vplivajo tudi številni biološki faktorji, ki so neodvisni od okoljskih pogojev gojenja.

2.2 POSKUSNI MODELI ZA PREUČEVANJE HRUSTANČNEGA TKIVA

Ko hondrocite z mehansko in/ali encimsko obdelavo izoliramo iz naravnega okolja, kjer so popolnoma obdani z izvenceličnim matriksom in jih gojimo v različnih *in vitro* celičnih kulturah, se njihove fenotipske lastnosti spremenijo. Proces spremembe celičnega fenotipa iz sklepnega v fibroblastom podoben tip imenujemo dediferenciacija. Med dediferenciacijo se oblika celic spremeni iz okrogle v podolgovato, spremeni se izražanje genov za sintezo strukturnih enot izvenceličnega matriksa in sam celični metabolizem. Posledica dediferenciacije so spremenjene biomehanske lastnosti tkiva (Tallheden in sod., 2004).

Uporabljajo se številni poskusni modeli za preučevanje normalnega razvoja hrustančnega tkiva, mehanizmov dediferenciacije in degeneracije hondrocitov, izražanja specifičnih genov in mehanizmov odziva na različne kemične spojine. Najbolj pogosto se uporabljajo naslednji poskusni modeli: primarna kultura hondrocitov, klonske celične linije, netransformirane nesmrtnne celične linije, celične linije z izzvano nesmrtnostjo in kulture organa iz rezin hrustanca (Lin in sod., 2006).

2.2.1 Primarna kultura hondrocitov

Primarno celično kulturo definiramo kot kulturo, ki je vzgojena neposredno iz hrustančnega tkiva darovalca. Primarne kulture so najbolj podobne izvornemu tkivu in so zato najbolj primerne za preučevanje normalne fiziologije hondrocitov in bolezenskih procesov v hrustančnem tkivu. Njihova slabost je omejeno število podvojitvev, odvisnost hitrosti rasti od starosti darovalca in hitra dediferenciacija (Lin in sod., 2006). Zaradi omejenega števila podvojitvev imajo celice v primarni celični kulturi omejen čas živosti v pogojih *in vitro*.

2.2.2 Klonske celične linije

Klonske celične linije so netransformirane celične linije, ki jih pridobimo iz tumorskega tkiva enega darovalca. Njihova prednost je daljši čas živosti v pogojih *in vitro*. Uporabne so za preučevanje dediferenciacije, odgovorov na kemične spojine, sinteze sestavnih delov izvenceličnega matriksa, mineralizacije v procesu tvorbe kosti in izražanja genov. Vendar tumorski izvor tkiva lahko vpliva na biološke lastnosti kulture. Človeške hondrocitne klonske celične linije so HCS-2/8, Ch-1 in ATDC5 (Lin in sod., 2006).

2.2.3 Celične linije z izzvano nesmrtnostjo

V celicah lahko izzovemo nesmrtnost z vnosom določenih DNA zaporedij. Takšne celice ohranijo morfologijo hondrocitov v več kot 80-tih pasažah, čeprav je tudi pri njih opazna izguba specifičnih fenotipskih lastnosti. Človeške hondrocitne nesmrtnne celične linije so T/C-28a2, T/C-28a4 in C-28/I2 (Finger in sod., 2003).

2.2.4 Kulture organov

Kulturo organa definiramo kot tehniko vzdrževanja rasti živalskih organov v pogojih *in vitro* (Lin in sod., 2006). Njihova prednost je histološka enakost tkiva z izvornim in ohranjenost strukturnih povezav med celicami in mikrookoljem. Zato so najbolj uporabne za preučevanje biomehanskih in biokemijskih lastnosti hrustančnega tkiva ter mehanizmov nastanka različnih bolezenskih stanj (Grodzinsky in sod., 2000).

Slabost kulture organa je omejitev v velikosti kulture, ki jo pogojuje difuzija hranilnih snovi v tkivo. Zato je skoraj nemogoče gojiti kulturo, ki presega 1 cm^3 (Lin in sod., 2006).

2.3 METODE GOJENJA HONDROCITOV

Tako kot različne celične linije so se tudi različne metode gojenja razvile z namenom preučevanja hondrocitov pri različnih pogojih ter njihove potencialne uporabe pri zdravljenju bolezni in poškodb hrustanca. Metode gojenja vključujejo enoslojne kulture, tridimenzionalne sisteme, kulture organov in različne modele za transplantacijo (Lin in sod., 2006).

2.3.1 Enoslojna kultura

Enoslojna kultura je nespecifična metoda za gojenje hondrocitov in temelji na postopkih, skupnih večini celičnih kultur. Po izolaciji posameznih celic iz tkiva celice resuspendiramo v tekočem mediju. Medij najpogosteje vsebuje goveji fetalni ali humani serum, askorbinsko kislino, gentamicin (ali penicilin ali streptomycin) in protiglivične snovi, ki preprečuje kalitev glivnih spor. Celice gojimo v inkubatorjih pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, v atmosferi s 5 % CO_2 in vlago, dokler ne prerastejo celotne površine gojilne posode. Ta pojav imenujemo 100 % konfluenca. Konfluentno kulturo odstranimo iz gojilne posode s pomočjo tripsina. Po odstranjevanju tripsina prenesemo celice v večjo gojilno posodo s svežim gojilnim medijem. Tako nastalo hčerinsko kulturo imenujemo prva pasaža (Lin in sod., 2006).

Enoslojna kultura je splošno uporabljena metoda gojenja hondrocitov, ker je ekonomična, tehnološko relativno nezahtevna in omogoča namnoževanje velikega števila celic. Pomanjkljivost enoslojne kulture je hitra dediferenciacija hondrocitov, ki povzroči tudi slabo reprezentativnost kulture v primerjavi z naravnim hrustancem (Benya in Shaffer, 1982; Gianonni in Cancedda, 2006).

2.3.2 Tridimenzionalne kulture

Tridimenzionalne kulture predstavljajo za hondrocite bolj naravno okolje, v katerem se bolj optimalno izražajo za hialini sklepni hrustanec specifični geni (kolagen II, agrekan). Dediferenciranim celicam, prenešenim iz enoslojne v tridimenzionalno kulturo, se deloma povrne specifičen fenotip in okrogla morfologija (Benya in Shaffer, 1982; Bonaventure in sod., 1994; Chubinskaya in sod., 2001; Tallheden in sod., 2004).

Za pripravo tridimenzionalnih kultur se precej uporabljajo alginati, linearni polisaharidi iz morskih alg, ki v prisotnosti kalcijevih ali drugih dvovalentnih ionov tvorijo gel. Alginati sodijo v skupino naravnih nosilcev. V isto skupino sodijo tudi kolagen, fibrin in želatina. Obstajajo tudi številni sintetični nosilci (Lin in sod., 2006). V času priprave poltrdnega tkivno-inženirskega pripravka, v polstrjeni nosilec zamešamo celice in ustvarimo pogoje za njegovo popolno zamreženje. Nosilec omogoči celicam rast v treh dimenzijah prostora. Pripravke iz celic in nosilca gojimo v enakem gojilnem mediju kot enodimenzionalne celične kulture (Kupchik in sod., 1983; Guo in sod., 1989).

V tridimenzionalnih kulturah alginatov se srečamo s problemom difuzije kisika, hranil in signalnih molekul v osrednji del konstruktov (Ohlendorf in sod., 1996; Heywood in sod., 2004). Problem je tudi počasna delitev celic v primerjavi z enoslojno kulturo, kar je verjetno posledica podaljšanja interfaze na naravno dolžino. V enoslojni kulturi je namreč interfaza bistveno skrajšana zaradi prisotnosti seruma v gojilnem mediju, ki pospešuje proliferacijo celic, in je tudi to lahko razlog za dediferenciacijo (Strehl in sod., 2002).

Za gojenje hondrocitov v tridimenzionalnih kulturah uporabljamo tudi različne tipe bioreaktorjev. Bioreaktor je posoda, v kateri pod kontroliranimi pogoji potekajo biološke reakcije. Bioreaktorski sistem lažje posnema naravne pogoje rasti in razvoja hrustančnega tkiva, poveča koncentracijo kisika v gojilnem mediju, natančno kontrolira pogoje gojenja in omogoča homogeno razporeditev hranil. Zato je zanesljiv model za preučevanje hondrocitov in ga lahko uporabimo tudi za proizvodnjo hrustančnega tkiva oz. pripravkov (Bilgen in sod., 2005).

Tretja metoda gojenja hondrocitov v tridimenzionalnih kulturah je peletna kultura. Razvoj metode temelji na odkritju, da hondrociti za vzdrževanje hondrocitnega fenotipa zahtevajo visoke koncentracije celic in se ob prehodu iz nižje v višjo koncentracijo celic v okolju rediferencirajo. Stabilizacija fenotipa je dosežena že pri nasajevanju 4×10^5 celic/cm² peleta. Poročajo, da hondrociti, gojeni v obliki peletne kulture, kažejo podobnosti v razporeditvi celic, sestavi izvenceličnega matriksa in ultrastrukturi tkiva izvirnega hrustanca (Schulze-Tanzil, 2002; Zhang in sod., 2004).

2.4 METODE ZA ANALIZO IZRAŽANJA GENOV, KI KODIRAJO KOMPONENTE IZVENČELIČNEGA MATRIKSA

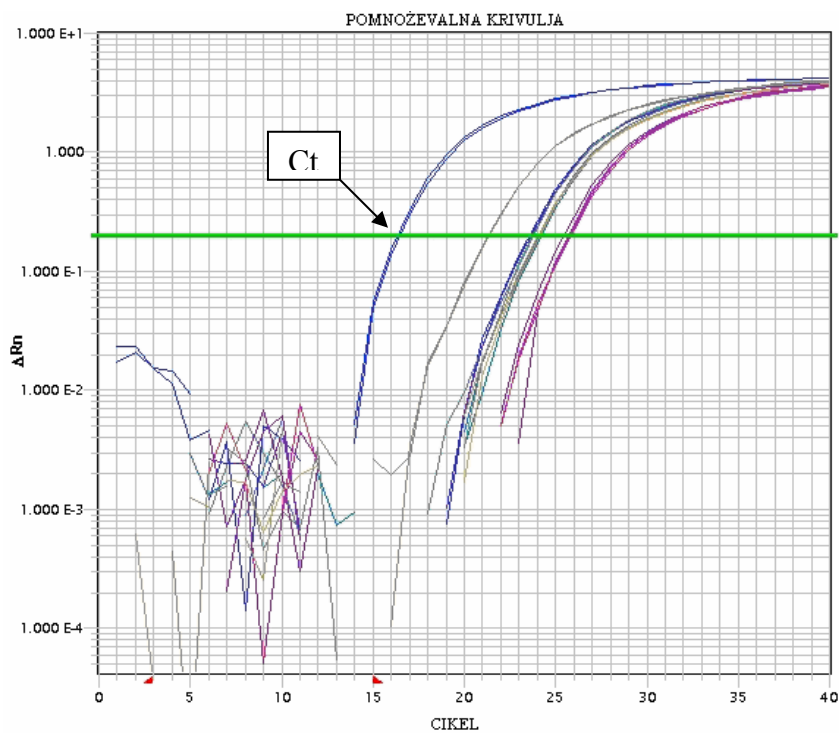
Za analizo sinteze specifičnih strukturnih komponent izvenceličnega matriksa hondrocitov so v uporabi različne metode: imunocitokemijske, SDS-PAGE, prenos po Westernu, *in situ* hibridizacija in prenos po Northernu. Te metode niso dovolj občutljive za določanje nizkega nivoja izražanja genov in dovolj natančne za določanje celotnega spektra izražanja. V zadnjem času se uveljavljata še dve metodi: mikromreže in verižna reakcija pomnoževanja v realnem času (RT-PCR). Njihova prednost je natančnost in občutljivost (Binette in sod., 1998; Martin in sod., 2001; Tallheden in sod., 2004; Marlovits in sod., 2004).

Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času je kvantitativna metoda za ugotavljanje količine mRNA v celici. Temelji na treh korakih: prepisu RNA v cDNA s pomočjo reverzne transkriptaze, detekciji in kvantifikaciji produktov pomnoževanja. Od klasične izvedbe reakcije PCR se razlikuje po načinu zaznavanja produkta. Pri klasični reakciji zaznamo in kvantificiramo produkt šele po končani reakciji, ko krivulja pomnoževanja že doseže plato. Izvedba v realnem času pa omogoča zaznavanje produkta v eksponencialni fazi pomnoževanja. To nam omogoča uporaba fluorescenčno označene sonde, ki se med reakcijo veže na komplementno mesto na tarčni cDNA, in sicer med oba začetna oligonukleotida. Obstajajo različno označene fluorescenčne sonde. Ena izmed njih ima na 5'-koncu vezano fluorescenčno barvilo 6-karboksifluorescin, katerega emisijski spekter se duši z na 3'-koncu vezanim barvilom 6-karboksitetrametil-rodamin. Ko DNA polimeraza odcepi sondo, se sprostita tudi obe barvili, kar onemogoči dušenje emisijskega spektra, ki ga oddaja 6-karboksifluorescin. Emitirana fluorescenca je sorazmerna količini sproščenih sond oz. količini nastalega produkta. Zaporedni cikel, pri katerem krivulja pomnoževanja oz. intenziteta fluorescence (Slika 2) doseže določen nivo, predstavlja vrednost Ct (threshold cycle, mejni cikel). Vrednost Ct je obratno sorazmerna začetni koncentraciji cDNA v vzorcu. Metoda omogoča tudi istočasno analizo več različnih genov (Nolan in sod., 2006).

Na zanesljivost kvantifikacije mRNA s pomočjo RT-PCR vplivajo trije dejavniki:

- količina in kvaliteta matrične verige (čistost, celovitost RNA molekul, prisotnost zavirajočih snovi),
- spremenljivost v rezultatih reakcije prepisovanja RNA v cDNA, ki ni standardizirana,
- nestandardiziranost protokolov za izvedbo reakcije in subjektivna analiza rezultatov, ki lahko zmede in prikrije dejanske rezultate.

Večjo ponovljivost omogoča standardizacija postopkov, uporabljenih reagentov in pogojev izvajanja analiz ter interpretacije rezultatov (Nolan in sod., 2006).



Slika 2: Grafično predstavljen rezultat verižnega pomnoževanja v realnem času (RT-PCR). Na osi x so prikazani zaporedni cikli pomnoževanja, na osi y pa intenziteta fluorescenčnega sevanja barvil. S Ct je označen mejni cikel pri RT-PCR.

2.5 TKIVNO INŽENIRSTVO HRUSTANČNEGA TKIVA

2.5.1 Strategije zdravljenja hrustančnega tkiva

Osnovni cilj tkivnega inženirstva je obnavljanje biološkega tkiva z uporabo celic, ki jim v nosilcih iz ustreznih materialov ustvarimo ugodne mikropogoje za rast, razmnoževanje in izražanje specifičnih genov. Osnovni elementi tkivnega konstrukta so celice, nosilec in gojilni medij (Vacanti C. A. in Vacanti J. P., 2000).

Razvoj metod zdravljenja hrustančnega tkiva poteka na več področjih. Cilj je uspešno zdravljenje različnih bolezenskih stanj, od obnove in preoblikovanja hrustanca obraza, obnove hrustanca zgornjih dihalnih poti in trahej, zdravljenja urinarne inkontinence in vezikoureteralnega refluksa do zdravljenja poškodb in bolezenskih stanj sklepnega hrustanca (Vacanti in Langer, 1999; Lin in sod., 2006). V pregledu strategij zdravljenja sem se omejila na zdravljenje sklepnega hrustanca.

Hrustančno tkivo predstavlja velik izziv za zdravljenje zaradi svojih specifičnih lastnosti, ki vključujejo počasno rast, obilen izvencelični matriks, ki predstavlja edini medij za prehranjevanje in komunikacijo z okoljem ter hitro dediferenciacijo v celičnih kulturah (Haudenschild in sod., 2001; Gründer in sod., 2004). Ker je naraven proces zdravljenja hrustančnega tkiva omejen na tvorbo biomehansko manjvrednega fibroznega tkiva, ki s časom razpade in omogoči razvoj osteoartritisa, je prišlo do razvoja različnih postopkov, ki posredujejo izboljšanje funkcionalnosti in lajšanje simptomov. Postopku, ki vključuje celične kulture celic lastnih bolniku, pravimo avtologna implantacija hondrocitov (Darling in Athanasiou., 2005; Ruano-Ravina in Diaz, 2006).

2.5.1.1 Avtologna implantacija hondrocitov

Avtologna implantacija hondrocitov temelji na zdravljenju poškodovanega hrustančnega tkiva s celicami, ki so bolniku lastne. Poteka v dveh fazah. V prvi fazi odvzamemo košček zdravega hialinega hrustančnega tkiva iz poškodovanega sklepa, izoliramo hondrocite in jih v obliki enoslojne kulture namnožimo do ustreznega števila. V naslednji fazi celice v obliki suspenzije vnesemo na poškodovano mesto, poškodbo pa prekrijemo s slojem površinskega kostnega tkiva – periosta, ki ga pridobimo iz golenice. Kostno tkivo dodatno učvrstimo z biološkim fibrinskim lepilom. Metoda se rutinsko uporablja kot standardna metoda zdravljenja poškodovanega hrustanca (Brittberg in sod., 1994). Na osnovi sledenja 213-ih bolnikov, zdravljenih na Švedskem od leta 1987 do 2001, je ugotovljena uspešnost metode od 84 % do 90 % (Brittberg in sod., 2001).

Pri izvedbi se pojavljajo določene težave. Prvi problem, ki ga srečamo, je izolacija zadostnega števila celic iz majhne količine odvzetega tkiva. Drugi problem je odvisnost hitrosti rasti hondrocitov od starosti darovalca – tkivo, odvzeto iz starejših ljudi, počasneje raste, ima različen odziv na sestavine gojilnega medija in se hitreje dediferencira. Tretji

problem je hitra dediferenciacija hondrocitov med gojenjem v enoslojni kulturi, ki je nujno potrebna za namnožitev celic. Problem predstavlja tudi preprečevanje izlitja suspenzije iz mesta poškodbe (Giannoni in Cancedda, 2006).

Izboljšanje metode poteka v smeri uporabe nosilcev iz različnih materialov, v katerih se hondrocitom deloma povrne izvorni fenotip (Darling in Athanasiou., 2005). Razlogi za nepopolno povrnitev fenotipa niso še popolnoma pojasnjeni. Na fenotip hondrocitov, gojenih v tridimenzionalnih kulturah, namreč vplivajo številni faktorji, od gostote celic, homogenosti razporeditve znotraj konstrukta, časa inkubacije pred vnosom v bolnika, do debeline konstrukta, ki vpliva na difuzijo hranil, kisika in rastnih dejavnikov. Tudi sestava gojilnega medija ni jasno definirana; v poskusih različnih raziskovalnih skupin se uporabljajo različni dodatki (Haudenschild in sod., 2001; Strehl in sod., 2002; Gründer in sod., 2004; Darling in Athanasiou., 2005).

2.5.1.2 Z matriksom inducirana avtologna implantacija hondrocitov

Od leta 1999 se uporablja tudi različica avtologne implantacije hondrocitov; z matriksom inducirana avtologna implantacija hondrocitov. Metoda temelji na vnosu hondrocitov, nanešenih na membrano iz kolagena I/III, pridobljenega iz prašiča. Prednost metode pred izhodno je odsotnost potrebe po kostnem tkivu in nižji nivo dediferenciacije. Klinično ocenjevanje metode je v teku (Cherubino in sod., 2003).

2.5.2 Vloga in lastnosti nosilcev pri pripravi tkivnih konstruktov iz hondrocitov

Idealni nosilec, ki ga lahko uporabimo pri pripravi tkivnih konstruktov, naj bi imel naslednje lastnosti:

- standardizirano sestavo in postopek priprave,
- združljivost s tkivom, v katero se vnaša,
- biorazgradljivost s kontrolirano hitrostjo razgradnje, ki ustreza hitrosti nastanka novega tkiva,
- biomehanske lastnosti, podobne izhodnemu tkivu,
- zgradbo iz materialov, ki omogočajo pritrditev celic, njihovo premikanje in delitev, difuzijo hranil in odpadnih snovi (Hutmacher in sod., 2001).

Vloga nosilca je mehanska podpora celicam, ustvarjanje ustreznega tridimenzionalnega okolja, ki spodbuja izražanje za sklepni hrustanec specifičnih genov (kolagen II in agrekan) in olajšan kirurški poseg v primerjavi s celicami v suspenziji. Pomembna vloga je tudi prenos fizikalnih signalov iz okolja na celice – mehanske obremenitve, ki so prisotne v naravnem okolju sklepnega hrustanca (Vacanti C. A. in Vacanti J. P., 2000).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK POSKUSOV

Iz biopsijskih vzorcev sklepnega hrustančnega tkiva treh bolnikov in zamrznjenih primarnih kultur hondrocitov dveh bolnikov smo pripravili enoslojne kulture hondrocitov (nasaditvena gostota je bila 3000 celic/cm²). Bolniki so bili različno stari: 26 let (NN), 27 let (KL), 37 let (DS), 38 let (RK) in 40 let (ŠR). Celice iz primarnih kultur smo gojili do 100 % konfluente. 100 % konfluenco definiramo kot popolno prerast dna gojilne posode. Po doseženi 100 % konfluenci smo celice odlepili iz gojilne posode s pomočjo tripsina in nasadili v prvo pasažo. Celice iz prve pasaže smo po doseženi 100 % konfluenci odlepili s pomočjo tripsina in prešteli skupno število celic s pomočjo hemocitometra.

V naslednjem koraku smo 300 000 celic prve pasaže odvzeli za izolacijo RNA, del kulture smo nasadili v diske iz mešanice alginata in agaroze, in sicer v koncentracijah 1 x 10⁶/ml, 5 x 10⁶/ml in 10 x 10⁶/ml gela. Preostale celice iz prve pasaže smo nasadili v gojilno posodo za enoslojno rast druge pasaže (nasaditvena gostota je bila 3000 celic/cm²). Gojilni medij smo zamenjali dvakrat na teden in po 14-ih dneh inkubacije analizirali živost celic v diskih iz gela. Iz vzorcev enosloja druge pasaže in posameznih diskov iz gela smo odvezemali vzorce celic za izolacijo RNA.

Živost celic v gelu smo testirali z dvema metodama: z vitalnim barvanjem z barvilom MTT (dimetiltiazol-difeniltetrazol bromid in tiazolilsko modrilo) in barvanjem s fluorescenčnimi barvili fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom.

Iz vzorcev smo s pomočjo GenElute Mammalian Total RNA Kita (Sigma, ZDA) izolirali celotno RNA. Potem smo prepisali RNA v cDNA s pomočjo reverzne transkriptaze in cDNA analizirali z metodo PCR v realnem času. Zanimalo nas je izražanje genov, ki kodirajo gradbene enote, specifične za sklepnih izvecelični matriks (kolagen II in agrekan), in genov, ki kodirajo gradbene enote, specifične za fibroblastni tip hrustančnega tkiva (kolagen I in verzikan). Izražanje genov smo analizirali z programi SDS 2.1 (Applied Biosystems, ZDA) in Microsoft Excel.

3.2 POSTOPEK GOJENJA CELIČNIH KULTUR

3.2.1 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.2.1.1 Kemikalije

- D-MEM/F12 (1:1) (Gibco, ZDA)
- DMSO (Sigma, ZDA)
- CaCl₂ (25 mM) (Merck, Nemčija)
- Humani serum (Zavod RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani, Educell d.o.o.)
- Fungizon (250 µg/ml) (Gibco, ZDA)
- Gentamicin (50 µg/ml) (Gibco, ZDA)
- HBSS (Gibco, ZDA)
- Gel (mešanica 1 % alginata in 1,5 % agaroze; Lot: GEL 210604) (TBF, Francija)
- Kolagenaza II (342 U/ml) (Gibco, ZDA)
- Lizirajoči pufer (Sigma, ZDA)
- β-Merkaptoetanol (Sigma, ZDA)
- Tripansko modriilo (Gibco, ZDA)
- Tripsin/EDTA (0,5 g tripsina, 0,2 g EDTA, 0,85 g NaCl/1) (Sigma, ZDA)

3.2.1.2 Droben laboratorijski material

- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Celična sita 40 µm (Falcon, ZDA)
- Epruvetke za zamrzovanje (Costar, ZDA)
- Hemocitometer – Neubauerjeva komora (Sigma, ZDA)
- Injekcijske brizge 20 in 50 ml (Tyco Kendall, Združeno kraljevstvo V. B. In S. I.)
- Krovna stekla
- Mikrocentrifugirke 1,5 ml (Costar, ZDA)
- Pinceta
- Pipete za enkratno uporabo 2, 5, 10 in 50 ml (Costar, ZDA)
- Pipetni nastavki 10-100 µl in 100-1000 µl (Costar, ZDA)
- Gojilne plošče s 6 in 24 luknjami (TPP, Švica)
- Polipropilenske centrifugirke 15 in 50 ml (Falcon, ZDA in TPP, Švica)
- Polipropilenske petrijevke 35 mm (TPP, Švica)
- Posode za gojenje celičnih kultur 25 cm² in 150 cm² (Costar, ZDA)
- Posoda za počasno zamrzovanje celic MrFrosty (Nalgene, ZDA)
- Skalpel
- Spatula
- Sterilizacijski filter Minisart 0,2 µm (Sartorius, Nemčija)
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke

3.2.1.3 Laboratorijska oprema

- Centrifuga (Tehtnica, PLC 322, Slovenija)
- CO₂ inkubator (Jouan IG 150, ZDA)
- Digitalni fotoaparati Nikon E900 (Nikon, Japonska)
- Rotacijski stresalnik, vortex, MS2 Minishaker (IKA, ZDA)
- Hladilnik (+4 °C) in zamrzovalnik (-20 °C) (Electrolux, Sweden)
- Invertni mikroskop TMS (Nikon, Japonska)
- Fluorescenčni mikroskop (Nikon, Japonska)
- Pipetor za pipete, Pipetboy (Integra, Švica)
- Tekoči dušik
- Grelni blok (Biometra, Nemčija)
- Zamrzovalnik (-80 °C) (HetoHolten, Danska)
- Zaščitna mikrobiološka komora (Iskra Pio, Slovenija)
- Vodna kopel (GFL, Nemčija)

3.2.2 Priprava primarne kulture hondrocitov iz vzorca hrustančnega tkiva

3.2.2.1 Izolacija hondrocitov

Transportni lonček s transportno tekočino in vzorcem smo prenesli v zaščitno mikrobiološko komoro. Tkivo smo s pinceto prenesli v petrijevko, omočeno z medijem za razgradnjo. Potem smo tkivo razrezali na majhne koščke in jih prenesli v 50 ml centrifugirko z 10 ml medija za encimsko razgradnjo. Centrifugirko smo površinsko očistili pred vnosom v CO₂ inkubator, kjer je potekala inkubacija 21 ur pri 37 °C.

Sestava medija za razgradnjo hrustančnega tkiva:

- 1 mg/ml kolagenaze II,
- 1 µg/ml gentamicina,
- 8 µg/ml fungizona,
- D-MEM/F12.

Medij za razgradnjo hrustančnega tkiva smo pripravili v 15 ml centrifugirki in ga pred uporabo sterilno prefiltrirali.

3.2.2.2 Priprava primarne kulture

Razgrajeno hrustančno tkivo smo prelili preko celičnega sita s premerom por 40 µm v 50 ml centrifugirko. Celično suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri 300 x g in pri sobni temperaturi ter odlili supernatant. Celično usedlino smo resuspendirali v 5 ml gojilnega medija in v 20 µl vzorca prešteli celice in določili skupno število celic (postopek je opisan v poglavju 3.2.4.2). V posodo za gojenje celičnih kultur s površino 25 cm² smo nasadili

75 000 celic, resuspendiranih v skupnem volumnu 2 ml. Pred vnosom celic smo v posodo dodali še 5 ml gojilnega medija za hondrocite. Gojilno posodo smo dobro zaprli, označili in površinsko očistili pred vnosom v CO₂ inkubator.

Sestava gojilnega medija za hondrocite:

- 15 % humanega seruma,
- 1 µg/ml gentamicina,
- 8 µg/ml fungizona,
- D-MEM/F12.

Medij smo pripravili v 50 ml centrifugirkah in ga pred uporabo sterilno prefiltrirali.

3.2.3 Priprava primarne kulture hondrocitov iz zamrznjenih vzorcev primarne kulture

3.2.3.1 Odmrzovanje vzorca

Epruvetko za zamrzovanje z zamrznjenimi hondrociti smo vzeli iz posode s tekočim dušikom in jo na hitro odtalili pri 37 °C. Med odtaljevanjem smo celicam s pipeto dodajali serum in jih prestavljali v 50 ml centrifugirko. S hitrim delom in dodajanjem seruma preprečimo toksično delovanje dimetilsulfoksida (DMSO). Celicam smo nato dodali 10 ml gojilnega medija in homogenizirali suspenzijo s stresanjem na rotacijskem stresalniku. V 20 µl vzorca smo prešteli celice in izračunali skupno število celic.

3.2.3.2 Priprava primarne kulture

Odmrznjene hondrocite smo centrifugirali 5 minut pri 300 x g in pri sobni temperaturi ter odlili supernatant. Celično usedlino smo resuspendirali s tresenjem na rotacijskem stresalniku in s pomočjo pipete. Celicam smo dodali 2 ml gojilnega medija in jih prenesli v gojilno posodo s površino 25 cm². Pred vnosom celične suspenzije smo v posodo dodali 5 ml gojilnega medija. Gojilno posodo smo dobro zaprli, označili in površinsko očistili pred vnosom v CO₂ inkubator.

3.2.4 Nasaditev hondrocitov v prvo pasažo

3.2.4.1 Tripsinizacija

Ko smo pod invertnim mikroskopom opazili pojav 100 % konfluence (popolne prerasti dna gojilne posode), smo celične kulture obdelali s tripsinom. Tripsin je encim, ki celice odlepi od dna gojilne posode.

Iz posode za gojenje celičnih kultur smo najprej odstranili izrabljen gojilni medij. Pritrjene celice smo 15 sekund spirali s sterilno raztopino za spiranje HBSS ob rahlem mešanju. Potem smo raztopino odstranili in jo nadomestili s 5 ml 0,5% raztopine tripsin/EDTA. Iz gojilne posode smo po 5-minutni inkubaciji v CO₂ inkubatorju odpipetirali celično suspenzijo in jo prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko. Delovanje tripsina smo ustavili z dodajanjem 5 ml gojilnega medija in suspenzijo centrifugirali 5 minut pri 300 x g in pri sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in ponovili spiranje. Iz suspenzije celic smo odvzeli 20 µl vzorca in prešteli celice.

3.2.4.2 Štetje celic s hemocitometrom

Celice smo prešteli po vsaki izolaciji iz biopsijskega tkiva in po tripsinizaciji. Iz suspenzije celic smo odvzeli 20 µl vzorca in mu dodali enak volumen raztopine tripanskega modrila. Tripansko modrilo vstopa izključno v mrtve celice, ki se zato obarvajo modro in jih ločimo od neobarvanih živih celic. S pipeto smo 20 µl mešanice prenesli pod krovno steklo hemocitometra in prešteli žive celice v obeh poljih. Povprečno število živih/mrtvih celic v obeh poljih smo delili z 9 (število kvadratkov v posameznem polju) in dobili povprečno število živih/mrtvih celic v kvadratu.

Skupno število živih in mrtvih celic v suspenziji smo računali po formuli:

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

N – skupno število živih/mrtvih celic v suspenziji

n – povprečno število prešteti živih/mrtvih celic v kvadratu

R – faktor redčenja zaradi mešanja s tripanskim modrilom (2)

V – volumen celične suspenzije, iz katere smo vzeli vzorec (ml)

Odstotek živih celic (%) = (število živih celic/skupno število vseh celic) x 100

3.2.4.3 Nasaditev celic v prvo pasažo

V 150 cm² posodo za gojenje celičnih kultur smo nasadili 450 000 celic in jim do 25 ml skupnega volumna dodali gojilni medij. Gojilno posodo smo dobro zaprli, označili in površinsko očistili pred vnosom v CO₂ inkubator.

3.2.4.4 Shranjevanje celic v tekočem dušiku

Celice, ki jih po izolaciji hondrocitov iz biopsijskega tkiva ali po tripsinizaciji nismo potrebovali za nadaljnje poskuse, smo zamrznili po naslednjem postopku. Najprej smo ugotovili skupno število celic v suspenziji in se odločili za število celic, ki jih želimo zamrzniti v posamezni epruvetki za zamrzovanje. Potem smo suspenzijo razdelili v centrifugirke z enakim številom celic in jih centrifugirali 5 minut pri 300 x g in pri sobni temperaturi. Supernatant smo odstranili in v celično usedlino ob steni in počasi (zaradi toksičnega vpliva dimetilsulfoksida na celice) dodali 2 ml medija za zamrzovanje. Mešanico smo prenesli v ohlajene epruvetke za zamrzovanje, epruvetke v posodo za počasno zamrzovanje MrFrosty in po 24-urni inkubaciji na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prenesli epruvetke v tekoči dušik ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Sestava medija za zamrzovanje (za 1 vzorec rabimo 2 ml medija):

- 1 ml seruma,
- 0,75 ml DMEM,
- 0,25 ml DMSO.

3.2.5 Nasaditev celic v drugo pasažo in diske iz gela

Ko so hondrociti dosegli 100 % konfluenco v prvi pasaži, smo jih tripsinizirali (postopek je opisan v poglavju 3.2.4.1) in prešteli skupno število živih celic (postopek je opisan v poglavju 3.2.4.2).

Od skupnega števila živih celic smo jih shranili približno 300 000 za nadaljnje analize (postopek je opisan v poglavju 3.2.7).

75 000 celic smo nasadili v posodo za gojenje celičnih kultur s površino 25 cm^2 – druga pasaža hondrocitov. Najprej smo ustrezen volumen izhodne celične suspenzije centrifugirali 5 minut pri 300 x g in pri sobni temperaturi ter odstranili supernatant. Potem smo celično usedlino s pomočjo pipete in rotacijskega mešala resuspendirali v 2 ml gojilnega medija in prenesli v gojilno posodo, v katero smo pred tem dodali 5 ml gojilnega medija. Posodo smo dobro zaprli, površinsko očistili in prenesli v CO_2 inkubator.

Iz števila preostalih celic smo izračunali ustrezne volumne gela, ki jih rabimo za doseganje koncentracij 1×10^6 , 5×10^6 in 10×10^6 celic/ml, in volumne celične suspenzije, ki ustrezajo posameznemu disku. Suspenzijo celic smo razdelili v 3 mikrocentrifugirke. V vsaki je bilo takšno število celic, ki ga rabimo za posamezni disk. Celice smo centrifugirali 5 minut pri 300 x g in pri sobni temperaturi ter odstranili supernatant do 30 μl celotnega volumna. Celično usedlino smo potem resuspendirali na rotacijskem mešalu. Gel smo segrevali v termobloku pri $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ do utekočinjenja. Nato smo ustrezne volumne gela prenesli v 3 luknje gojilne plošče s 24-imi luknjami in ohladili na približno $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. V posamezni disk smo s pomočjo nastavka za pipeto vmešali ustrezno število celic. Mešali smo počasi in previdno, da ni prišlo do tvorbe mehurčkov. Ploščo smo inkubirali 10 minut v hladilniku ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$), da se je agarosa strdila. Diske smo potem prekrili z CaCl_2 , ki

polimerizira alginat in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Sledilo je odstranjevanje CaCl_2 in prenos diskov v petrijevko, ki smo jo predtem omočili z gojilnim medijem. Vsak disk smo spirali z gojilnim medijem in jih potem s spatulo prenesli v posamezne luknje gojilne plošče s 6-imi luknjami. Vsakemu disku smo dodali 7 ml gojilnega medija za hondrocite, ploščo površinsko očistili in prenesli v CO_2 -inkubator.

3.2.6 Dohranjevanje celičnih kultur hondrocitov

Primarne celične kulture hondrocitov smo prvič dohranjevali po štirih dneh od dneva nasaditve. Celične kulture prvih pasaž, drugih pasaž in diskov iz gela smo dohranjevali vsak tretji dan. Izrabljen gojilni medij smo s pipeto odstranili iz gojilne posode in ga nadomestili z ustreznim volumnom svežega gojilnega medija, predgretega na 37 °C.

Primarne celične kulture, prve pasaže in druge pasaže smo gojili do dosežene 100 % konfluente, za diske iz gelov pa je bil čas gojenja 14 dni (Bonaventure in sod., 1994; Heywood in sod., 2004; Gründer in sod., 2004; Darling in Athanasiou, 2005).

3.2.7 Odvzem vzorcev za nadaljnje analize

Za izolacijo RNA smo pri vzorcu vsakega bolnika shranili:

- vzorec enoslojne kulture po tripsinizaciji celične kulture prve pasaže,
- vzorec enoslojne kulture po tripsinizaciji celične kulture druge pasaže,
- celotne diske iz gela.

Vzorci enoslojnih kultur smo centrifugirali 5 minut pri 300 x g in pri sobni temperaturi ter odlili supernatant. Diske iz gela smo s pomočjo spatule prenesli v petrijevko, omočeno z gojilnim medijem za hondrocite. Iz treh diskov iz gela smo odrezali po eno tanko rezino vzorca za določanje živosti celic. Preostanek diskov smo prenesli v mikrocentrifugirke.

Vzorci za izolacijo RNA smo prenesli v mikrocentrifugirke in dodali:

- v celične usedline vzorcev enoslojnih kultur: 250 µl lizirajočega pufra in 2,5 µl β-merkaptetanola,
- v vzorce diskov iz gela: 500 µl lizirajočega pufra in 5 µl β-merkaptetanola.

Tako pripravljene vzorce smo shranili v zamrzovalniku pri – 80 °C do analize.

3.3 KVALITATIVNO DOLOČANJE ŽIVOSTI HONDROCITOV V DISKIH IZ GELA

3.3.1 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.3.1.1 Kemikalije

- Fluorescein diacetat (1 mg/ml) (Molecular Probes, ZDA)
- MTT (10 %) (Sigma, Italy)
- PBS
- Propidijev jodid (1 mg/ml) (Molecular Probes, ZDA)

3.3.1.2 Droben laboratorijski material

- Pipete za enkratno uporabo 5 in 10 ml (Costar, ZDA)
- Polipropilenske centrifugirke 15 ml (Falcon, ZDA)
- Polipropilenske petrijevke 35 mm (TPP, Švica)
- Skalpel
- Spatula

3.3.1.3 Laboratorijska oprema

- CO₂ inkubator (Jouan IG 150, ZDA)
- Digitalni fotoaparati Nikon E900 (Nikon, Japonska)
- Fluorescenčni mikroskop (Nikon, Japonska)
- Invertni mikroskop TMS (Nikon, Japonska)
- Pipetor za pipete, Pipetboy (Integra, Švica)
- Zaščitna mikrobiološka komora (Iskra Pio, Slovenija)

3.3.2 Barvanje rezin gela z barvilom MTT

Iz treh diskov iz gela smo odrezali po eno tanko rezino vzorca. Rezine smo s spatulo prenesli v tri luknje gojilne plošče s 6-imi luknjami in jih prelili z 10% raztopino MTT. Kot negativno kontrolo smo uporabili rezino gela, ki ni vsebovala celic, in jo inkubirali na enak način. Ploščo smo površinsko očistili in prenesli v CO₂ inkubator za 4 ure. Med inkubacijo smo občasno opazovali rezine pod invertnim mikroskopom. Rezine smo po inkubaciji fotografirali.

Barvilo MTT je tetrazolijeva sol, topna v vodi. MTT vstopa v žive celice, kjer mitohondrijske dehidrogenaze cepijo tertazolijski obroč. Produkt reakcije je netopen vijolično-črni formazan (Gigante in sod., 2007).

3.3.3 Barvanje rezin gela s fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom

Rezine diskov smo s pomočjo spatule prenesli v tri luknje gojilne plošče s 6-imi luknjami. Pravilno delovanje barvila propidijev jodid smo preverili s pozitivno kontrolo – barvanje rezin diskov s hondrociti, ki smo jih pred tem inkubirali v destilirani vodi, kar je za evkariontske celice zaradi osmotskega šoka smrtno. Kot negativno kontrolo smo vzeli rezino gela brez celic. Rezine smo najprej prelili z 1 ml pufru PBS. Potem smo dodali 2 μ l fluorescein diacetata v koncentraciji 1 mg/ml in inkubirali 15 minut v CO₂-inkubatorju pri 37 °C. Potem smo s pipeto odstranili barvilo in sprali s pufrom PBS. Nato smo dodali 1 ml pufru PBS in 10 μ l propidijevega jodida s koncentracijo 1 mg/ml. Ploščo smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, odstranili barvilo in rezine spirali s pufrom PBS. Rezine smo opazovali pod fluorescenčnim mikroskopom in fotografirali.

Fluorescein diacetat je napolarna spojina, ki prehaja skozi celično membrano živih celic. Celične esterase cepijo diacetatno skupino, preostali fluorescein se nabira v celicah in fluorescira pri valovni dolžini 521 nm. Zato žive celice svetijo zeleno. Propidijev jodid lahko tudi prehaja celične membrane živih in mrtvih celic. Iz živih se takoj izloči, v mrtvih pa se veže na DNA. Vezava barvila na DNA poveča intenziteto fluoresciranja za faktor 20–30. Mrtve celice svetijo rdeče.

3.3.4 Fotografiranje

Celice smo fotografirali pred vsako tripsinizacijo, po barvanju z MTT in po barvanju s fluorescenčnimi barvili. Povečavo, pod katero je bila narejena slika, smo določili glede na povečavo mikroskopa in glede na optično povečavo digitalnega fotoaparata Nikon E900.

3.4 KVANTITATIVNO DOLOČANJE IZRAŽANJA SPECIFIČNIH GENOV V VZORCIH ENOSLOJNIH IN TRIDIMENZIONALNIH KULTUR

3.4.1 Uporabljene kemikalije, potrošni material in laboratorijska oprema

3.4.1.1 Kemikalije

- 70 % etanol, pripravljen iz 96 % (Pharmachem, Slovenija)
- DEPC (Sigma, ZDA)
- GenEluteTM Mammalian Total RNA Kit (Sigma, ZDA)
- High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, ZDA)
- Osnovna zmes - TaqMan[®] Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, ZDA)
- Prečiščena voda (Ph. Eur. 4th; Zavod RS za transfuzijsko medicino)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen kolagen II (TaqMan[®] Gene Expression Assays-Assays on DemandTM, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen kolagen I (TaqMan[®] Gene Expression Assays-Assays on DemandTM, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen agrekan (TaqMan[®] Gene Expression Assays-Assays on DemandTM, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen verzikan (TaqMan[®] Gene Expression Assays-Assays on DemandTM, Applied Biosystems, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi in sonda za človeški gen GAPDH (Human GAPDH Endogenous Control, Applied Biosystems, ZDA)

3.4.1.2 Droben laboratorijski material

- Aluminijska folija
- Folija za lepljenje optične reakcijske ploščice (ABI Prism Optical Adhesive Covers) (Applied Biosystems, ZDA)
- Luknjičasto pokrivalo za optično reakcijsko ploščico
- Mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- Optična reakcijska ploščica s 96 luknjicami (ABI Prism 96- Well Optical Reaction Plate) (Applied Biosystems, ZDA)
- Nastavki za pipete; 10, 100 in 1000 µl (Costar, ZDA)
- Stojalo za centrifugirke in mikrocentrifugirke

3.4.1.3 Laboratorijska oprema

- Aparat ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, ZDA)
- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)

- Centrifuga 5804 R (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga (Tehtnica, PLC 332, Slovenija)
- Električni stresalnik, vortex (MS2 Minishaker IKA, ZDA)
- Grelni blok (Eppendorf, Nemčija)
- Kadička z ledom
- Spektrofotometer BioPhotometer (Eppendorf, Nemčija)
- Zamrzovalnik (-80 °C) (HetoHolten, Danska)
- Zamrzovalnik (-20 °C) (Electrolux)

3.4.2 Izolacija RNA

RNA smo izolirali po navodilih iz sestava GenElute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma). Mikrocentrifugirko s celičnim lizatomo smo vzeli iz zamrzovalnika in jo pustili na sobni temperaturi do popolnega odtajanja. Lizat celic iz gelov smo prefiltrirali preko filtracijske kolone. Ker je bilo v vzorcih enoslojnih kultur manj kot 10^6 celic, pri teh vzorcih ni bilo potrebno filtriranje. Lizatu smo dodali enak volumen 70% raztopine etanola (250 μ l pri vzorcih monosloja oz. 500 μ l pri vzorcih gela) in premešali na rotacijskem mešalu. Lizat smo prenesli na kolono za vezanje in centrifugirali 15 sekund pri največjem številu obratov in pri sobni temperaturi. Kolono smo prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko in nanesti 500 μ l prve raztopine za spiranje. Po 15-sekundnem centrifugiranju pri največjem številu obratov smo kolono prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko in dodali 500 μ l druge raztopine za spiranje (predhodno razredčene s 70% etanolom). Centrifugirali smo 15 sekund pri največjem številu obratov. Spiranje z drugo raztopino za spiranje smo še enkrat ponovili z enakim volumnom in nato centrifugirali 2 minuti pri največjem številu obratov. Vezavno kolono smo prenesli v novo zbirno mikrocentrifugirko in odpipetirali 50 μ l raztopine za izpiranje. Centrifugirali smo 1 minuto pri najvišjih obratih in zbrali eluat, ki predstavlja izolirano RNA. Čistost in koncentracijo izolirane RNA smo preverili na spektrofotometru s preverjanjem razmerja absorbanc pri valovnih dolžinah vpadne svetlobe 260 nm in 280 nm. RNA smo shranili pri -80 °C do uporabe.

3.4.3 Prepis RNA v cDNA

Celotno RNA smo prepisali v cDNA, upoštevajoč navodila iz sestava High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). RNA smo vzeli iz zamrzovalnika in prenesli v posodo z ledom. Po potrebi smo vzorce redčili s prečiščeno vodo z 0,1 %DEPC. Kjer je bilo možno, smo za reakcijo vzeli 1,5 μ g RNA.

Transkripcijsko mešanico smo pripravili glede na število vzorcev iz naslednjih reagentov (za 1 vzorec):

- 5 μ l 10x pufra za obratno transkripcijo,
- 2 μ l 25x dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),
- 5 μ l 10x naključnih začetnih oligonukleotidov,

- 2,5 µl RNA – znega inhibitorja (1 U/ µl),
- 2,5 µl encima MultiScribe,
- 1,5 µg (ali manj) RNA,
- do 50 µl prečiščena voda z 0,1% DEPC.

Mešanico smo inkubirali v grelnem bloku: deset minut pri 25 °C, potem 120 minut pri 37 °C. Vzorce cDNA smo shranili v zamrzovalniku pri temperaturi – 20 °C.

3.4.4 Verižna reakcija pomnoževanja v realnem času (RT-PCR)

Mikrocentrifugirke z vzorci cDNA smo vzeli iz zamrzovalnika in prenesli v kadičko z ledom. Vzorce smo redčili s prečiščeno vodo z 0,1 %DEPC v razmerju 1 : 1.

V petih mikrocentrifugirkah smo posebej za vsaki gen (kolagen II, kolagen I, agrekan, verzikan in GADPH, ki služi kot endogena kontrola) zmešali ustrezno količino reagentov in pripravili reakcijsko mešanico, ki smo jo tudi prenesli na led. Sonde in začetne oligonukleotide smo med pripravo reakcijske zmesi zaščitili pred svetlobo s pomočjo aluminijске folije. Sestava reakcijske mešanice za 1 vzorec:

- 12,5 µl osnovne zmesi – TaqMan[®] Universal PCR MasterMix,
- 1,25 µl začetnih oligonukleotidov in sonde TaqMan[®] Gene Expression Assays-Assays on Demand[™],
- 6,25 µl prečiščene vode,
- 5 µl vzorca cDNA.

V optično ploščico s 96-imi luknjicami smo odpipetirali po 20 µl mešanice, nato pa dodali še 5 µl vzorca. Kot negativno kontrolo mešanice za posamezne gene smo v štiri luknjice namesto cDNA dodali po 5 µl prečiščene vode. Optično ploščico smo zalepili s samolepilno folijo in jo centrifugirali 2 minuti pri 1000 x g in pri sobni temperaturi. Potem smo jo prekrili z luknjičastim pokrivalom in vstavili v aparat ABI Prism 7900HT. V računalniškem programu SDS 2.1 smo izbrali sonde, volumen reakcije in število ciklov. Proces verižne reakcije pomnoževanja je potekal v treh fazah: 2 minuti pri 50 °C, 10 minut pri 95 °C in 40 ciklov pomnoževanja, ki so bili sestavljeni iz 15-ih sekund pri 95 °C in 1 minute pri 60 °C.

Po končani reakciji smo meritve analizirali s pomočjo programov SDS 2.1 in Microsoft Excel. Za vsak vzorec cDNA smo določili vrednost Ct, ki je obratno sorazmerna začetni koncentraciji cDNA, in predstavlja zaporedni cikel, pri katerem krivulja pomnoževanja (intenzitea fluorescence) preseže določen nivo. Ct-vrednost primerjalnega gena GADPH smo odšteli od Ct-vrednosti posameznega gena (ΔCt). Relativni nivo izražanja vsakega gena, ki kaže, ali je preučevani gen izražen v večjem ali manjšem obsegu kot primerjalni, smo potem računali po relaciji:

$$\text{Ekspresija} = 2^{\text{abs}(\Delta Ct)}$$

Vrednost relativnega izražanja genov smo za potrebe primerjanja posameznih vzorcev normalizirali s pomnoževanjem/deljenjem s 100.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

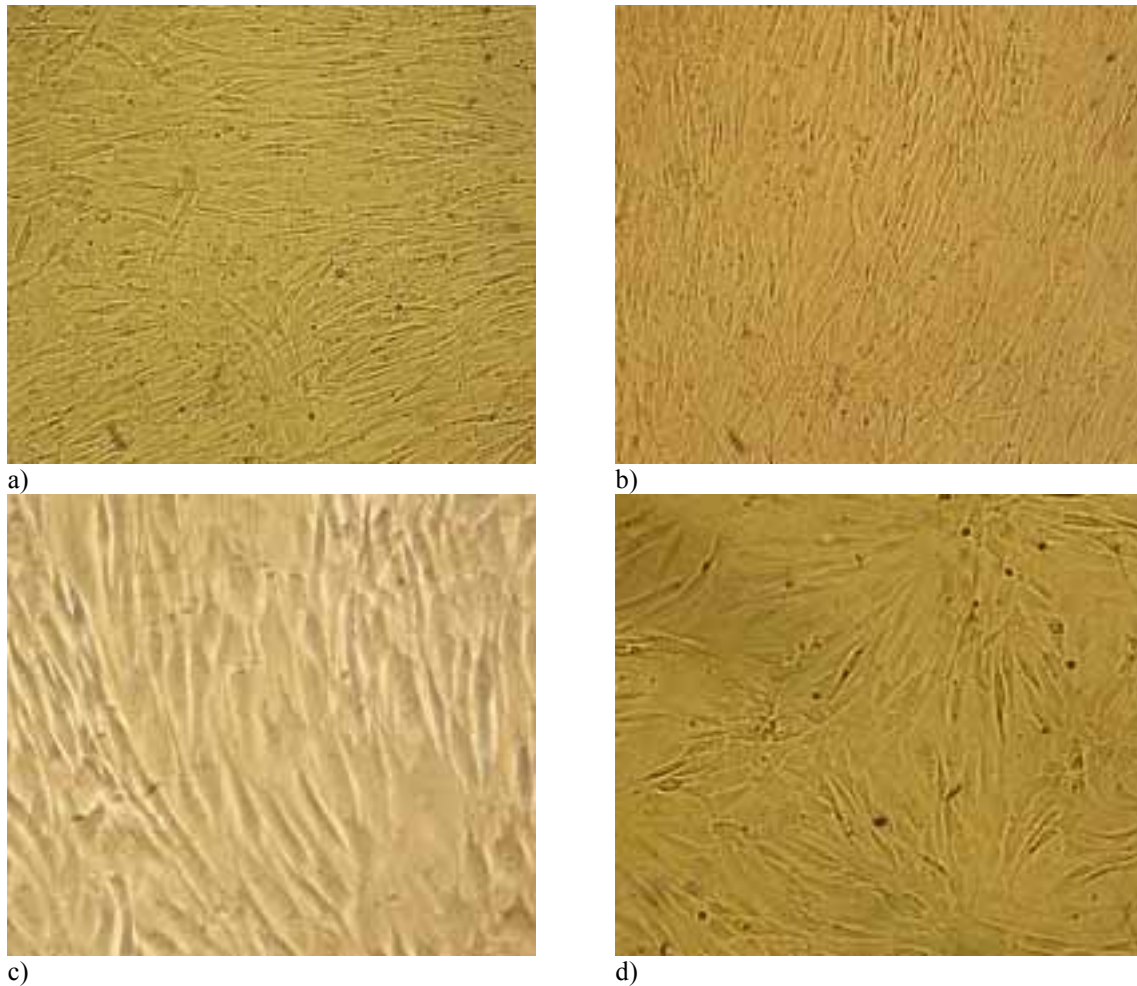
Ker sta kolagen II in agrekan tipična markerja za diferencirane hondrocite, kolagen I in verzikan pa za dediferencirane, smo iz normaliziranih vrednosti nivojev izražanja genov izračunali diferenciacijske indekse kot pokazatelje razmerja med številom mRNA molekul za kolagen II v primerjavi s kolagenom I (kol II/kol I) ter agrekana v primerjavi z verzikanom (agr/ver). Višje vrednosti diferenciacijskih indeksov kažejo, da je izražanje genov bolj podobno hondroцитom, medtem ko nižje vrednosti kažejo na izražanje genov, ki je bolj podobno fibroblastom (Martin in sod., 2001).

Zaradi biološke spremenljivosti med posameznimi vzorci bolnikov smo rezultate prikazali kot srednjo vrednost (mediana). Pri vsakem setu podatkov smo prikazali tudi minimalno in maksimalno vrednost. Primerjavo enoslojnih kultur druge pasaže z geli in primerjavo med geli z različnimi koncentracijami celic smo statistično vrednotili z neparametričnimi testi. Statistična analiza je bila narejena z računalniškim programom SPSS 13.0 za Windows. Najprej smo s Friedmanovim testom preverili razlike med nasaditvenimi gojišči (enoslojna kultura druge pasaže v primerjavi z različnimi koncentracijami celic v gelu). V primeru značilnih razlik smo opravili parne primerjave med vsakim od gojišč z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. Kot značilne smo opredelili tiste razlike, pri katerih smo dokazali, da je verjetnost ničelne hipoteze manjša od 5 % ($p < 0,05$).

4 REZULTATI

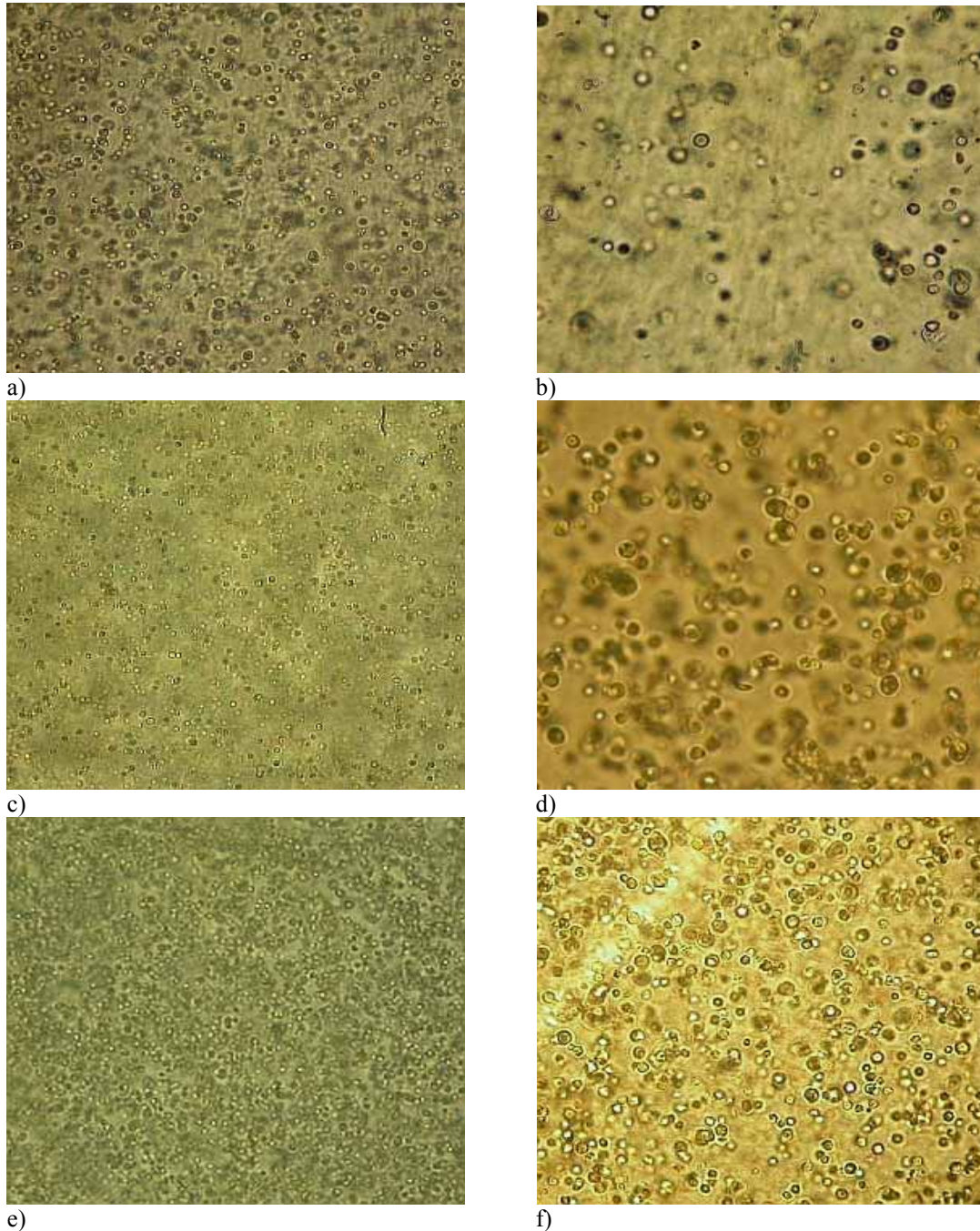
4.1 MORFOLOGIJA HONDROCITOV GOJENIH V ENOSLOJNI KULTURI

Hondrocite različnih bolnikov smo nasadili v enoslojne kulture in jih gojili do pojava 100 % konfluente (poglavja 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 in 3.2.6). Hondrociti, pridobljeni iz različnih bolnikov, so se pomnoževali različno hitro. Konfluentno fazo rasti so celične kulture v primarnih kulturah dosegle po minimalno 7-ih dneh (vzorca ŠR in RK) in maksimalno 12-ih dneh (vzorec NN). Celice so pred pritrjevanjem na dno gojilne posode kazale značilno okroglo morfološko obliko, ki se je po pritrjevanju in začetku delitev spremenila v podolgovato fibroblastno morfološko obliko (Slika 3). Pojav fibroblastne oblike celic je prvi dokaz dediferenciacije hondrocitov med gojenjem v enoslojni kulturi.



Slika 3: Fotografije konfluentnih primarnih kultur hondrocitov posnetih pri različnih povečavah. a) Primarna kultura hondrocitov bolnika ŠR, 40-kratna povečava; b) Primarna kultura hondrocitov bolnika KL, 40-kratna povečava; c) Primarna kultura hondrocitov bolnika ŠR, 100-kratna povečava; d) Primarna kultura hondrocitov bolnika KL, 100-kratna povečava

Po tripsinizaciji in nasaditvi hondrocitov v diske iz gela (poglavje 3.2.5) se je morfoloija celic spet spremenila v okroglo, hondrocitno. Morfoloija celic v gelu (Slika 4) je prvi dokaz rediferenciacije hondrocitov med gojenjem v tridimenzionalnem okolju.

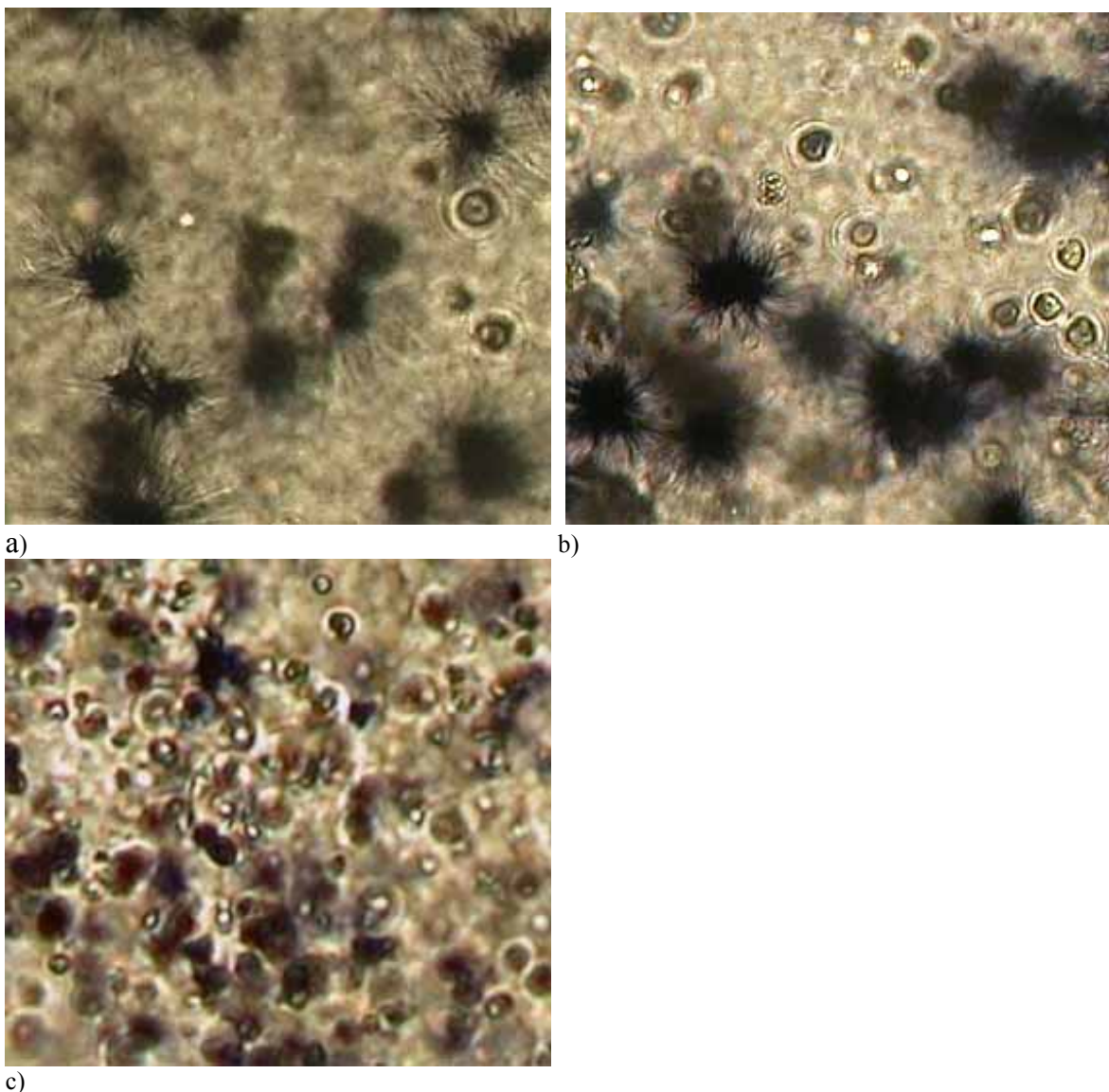


Slika 4: Fotografije kultur hondrocitov, izoliranih iz vzorca hrustanca bolnika KL, namnoženih v enoslojni kulturi in potem nasajenih pri različnih koncentracijah v diske iz gela. a) Hondrociti, nasajeni v disk v koncentraciji 1×10^6 /ml, 40-kratna povečava; b) Hondrociti, nasajeni v disk v koncentraciji 1×10^6 /ml, 100-kratna povečava; c) Hondrociti, nasajeni v disk v koncentraciji 5×10^6 /ml, 40-kratna povečava; d) Hondrociti, nasajeni v disk v koncentraciji 5×10^6 /ml, 100-kratna povečava; e) Hondrociti, nasajeni v disk v koncentraciji 10×10^6 /ml, 40-kratna povečava; f) Hondrociti, nasajeni v disk v koncentraciji 10×10^6 /ml, 100-kratna povečava

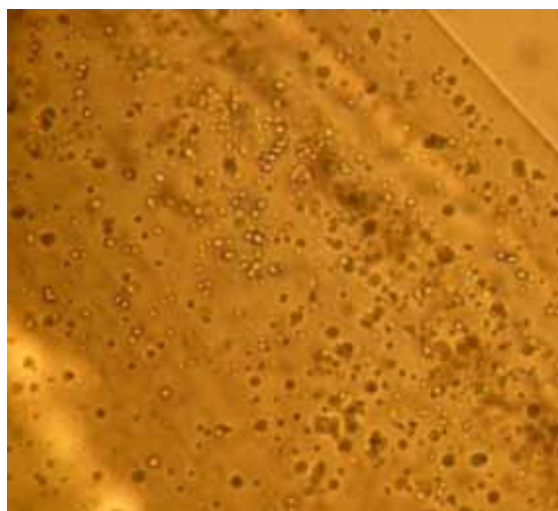
4.2 ŽIVOST CELIC ZNOTRAJ GELA PO 14-IH DNEH GOJENJA

Hondrocite smo po namnožitvi do določenega števila nasadili v diske iz mešanice alginata in agaroze (poglavje 3.2.5). Živost hondrocitov znotraj diskov smo kvalitativno določili z dvema metodama: barvanjem z MTT (poglavje 3.3.2) in barvanjem s fluorescenčnimi barvili fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom (poglavje 3.3.3). Pričakovali smo določeno število mrtvih celic v osrednjem delu diska zaradi omejene difuzije hranilnih snovi in kisika v gel.

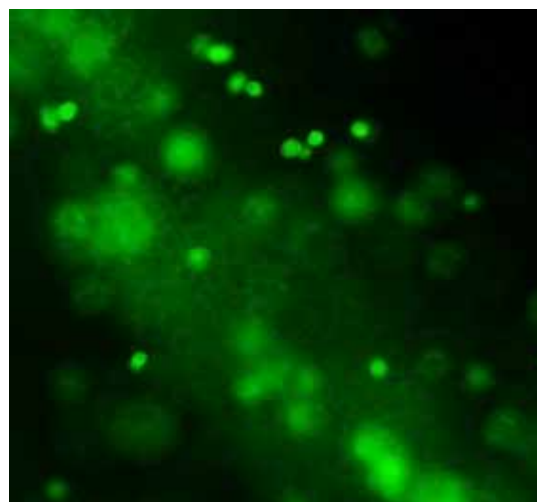
Rezultati barvanja z MTT so prikazani na Sliki 5, rezultate barvanja s fluorescenčnimi barvili pa prikazuje Slika 6.



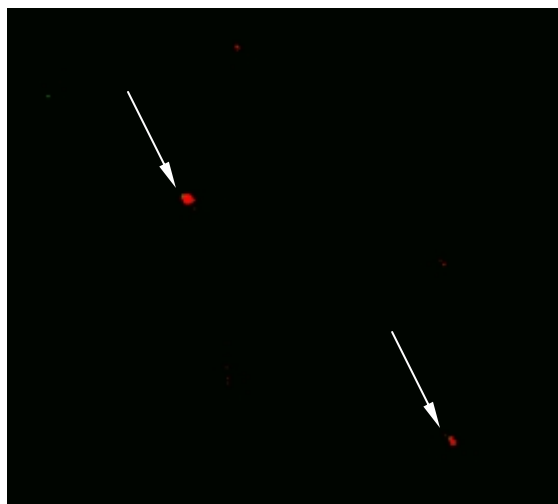
Slika 5: Fotografije rezin diskov iz gela, pripravljenih iz hondrocitov bolnika DS po barvanju z barvilom MTT. c) 10×10^7 celic/ml konstrukta



a)



b)



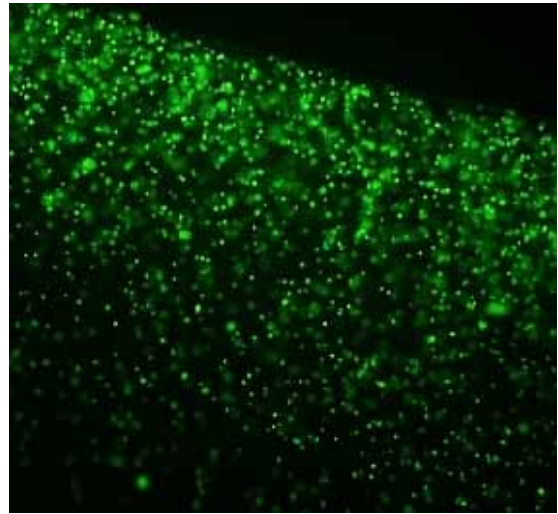
c)

Slika 6: Fotografije rezin diskov iz gela po barvanju s fluorescenčnimi barvili fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom. Za vsako koncentracijo celic je prikazana fotografija neobarvanega dela rezine {a), d) in g)} in istega pobarvanega dela rezine. Žive celice so pobarvane zeleno {fluorescein diacetat – b), e) in h)}, mrtve pa rdeče {propidijev jodid – c), f) in i)}. Mrtve celice so označene. Diski s koncentracijo celic $1 \times 10^6/\text{ml}$ konstrukta {a), b) in c)} so pripravljene iz hondrocitov bolnika RK, disk s koncentracijo $5 \times 10^6/\text{ml}$ konstrukta {d), e) in f)} iz hondrocitov bolnika DS, disk s koncentracijo hondrocitov $10 \times 10^6/\text{ml}$ {g), h) in i)} pa iz hondrocitov bolnika KL. j) negativna kontrola mrtvih celic – disk z hondrociti, inkubiran pred barvanjem v destilirani vodi.

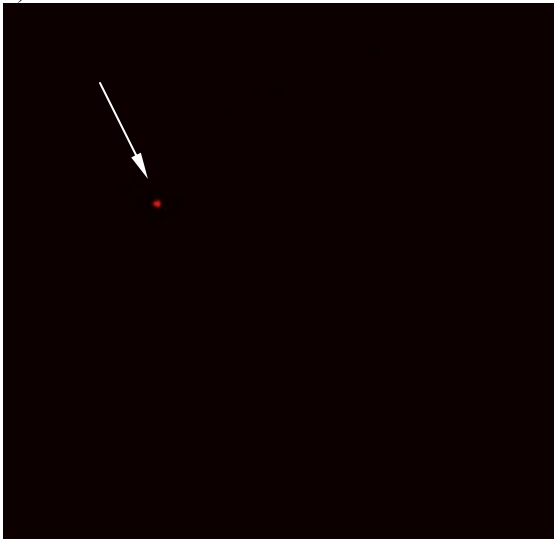
(se nadaljuje)



d)



e)



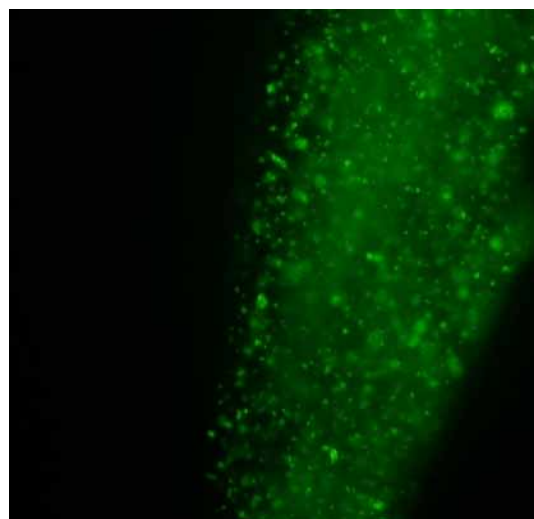
f)

nadaljevanje: Slika 6: Fotografije rezin diskov iz gela po barvanju s fluorescenčnimi barvili fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom. Za vsako koncentracijo celic je prikazana fotografija neobarvanega dela rezine {a, d) in g)} in istega pobarvanega dela rezine. Žive celice so pobarvane zeleno {fluorescein diacetat – b), e) in h)}, mrtve pa rdeče {propidijev jodid – c), f) in i)}. Mrtve celice so označene. Diski s koncentracijo celic $1 \times 10^6/\text{ml}$ konstrukta {a), b) in c)} so pripravljene iz hondrocitov bolnika RK, diski s koncentracijo $5 \times 10^6/\text{ml}$ konstrukta {d), e) in f)} iz hondrocitov bolnika DS, diski s koncentracijo hondrocitov $10 \times 10^6/\text{ml}$ {g), h) in i)} pa iz hondrocitov bolnika KL. j) negativna kontrola mrtvih celic – disk z hondrociti, inkubiran pred barvanjem v destilirani vodi.

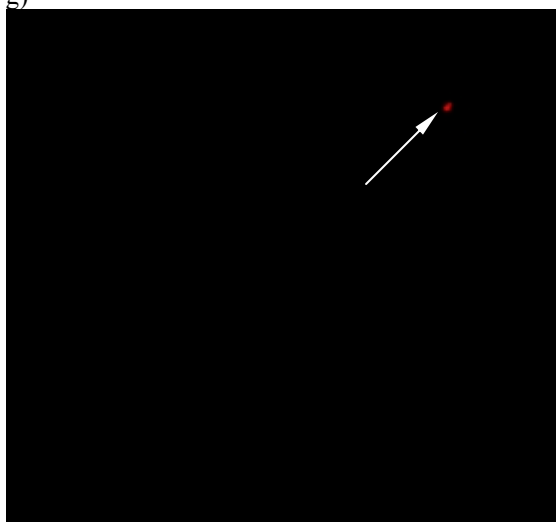
(se nadaljuje)



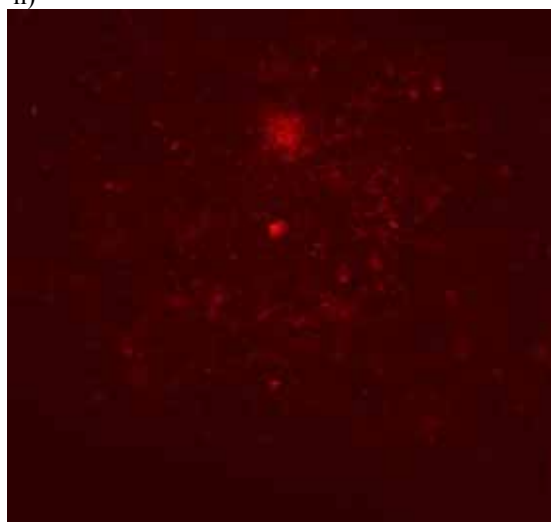
g)



h)



i)



j)

nadaljevanje: Slika 6: Fotografije rezin diskov iz gela po barvanju s fluorescenčnimi barvili fluorescein diacetatom in propidijevim jodidom. Za vsako koncentracijo celic je prikazana fotografija neobarvanega dela rezine {a), d) in g)} in istega pobarvanega dela rezine. Žive celice so pobarvane zeleno {fluorescein diacetat – b), e) in h)}, mrtve pa rdeče {propidijev jodid – c), f) in i)}. Mrtve celice so označene. Diski s koncentracijo celic $1 \times 10^6/\text{ml}$ konstrukta {a), b) in c)} so pripravljene iz hondrocitov bolnika RK, diski s koncentracijo $5 \times 10^6/\text{ml}$ konstrukta {d), e) in f)} iz hondrocitov bolnika DS, diski s koncentracijo hondrocitov $10 \times 10^6/\text{ml}$ {g), h) in i)} pa iz hondrocitov bolnika KL. j) negativna kontrola mrtvih celic – disk z hondrociti, inkubiran pred barvanjem v destilirani vodi.

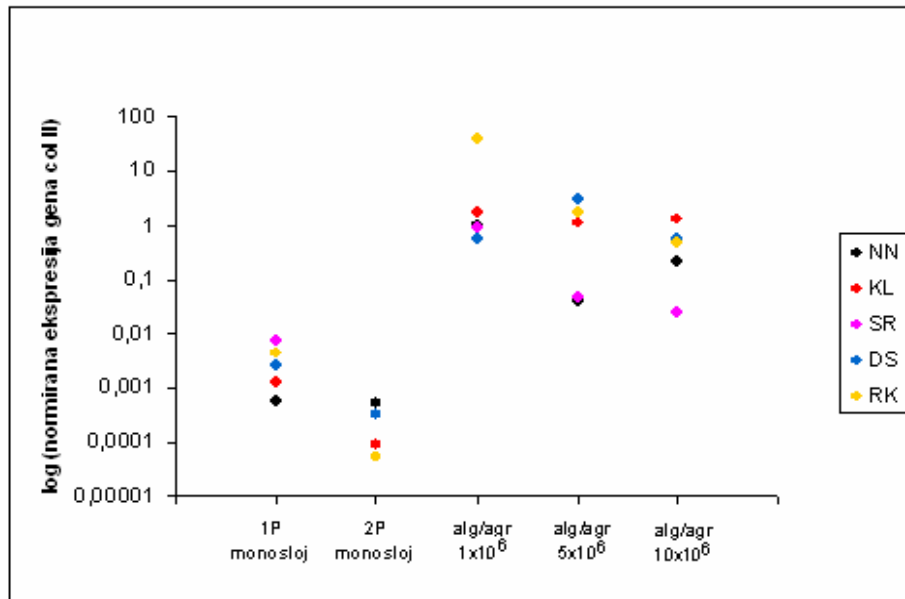
Obe metodi sta potrdili pričakovanja o visoki stopnji živosti celic. Več mrtvih celic smo opazili po barvanju z MTT. Pri barvanju s fluorescenčnimi barvili smo pri vseh treh koncentracijah celic v gelu opazili zelo malo mrtvih celic. Pozitivna kontrola je potrdila pravilno delovanje barvila propidijev jodid. Hipotezo o večjem številu mrtvih celic v osrednjem delu diskov je bilo težko oceniti zaradi nestandardizirane debeline rezin.

4.3 IZRAŽANJE GENOV SPECIFIČNIH ZA SKLEPNO HRUSTANČNO TKIVO – DEDIFERENCIACIJA IN REDIFERENCIACIJA HONDROCITOV

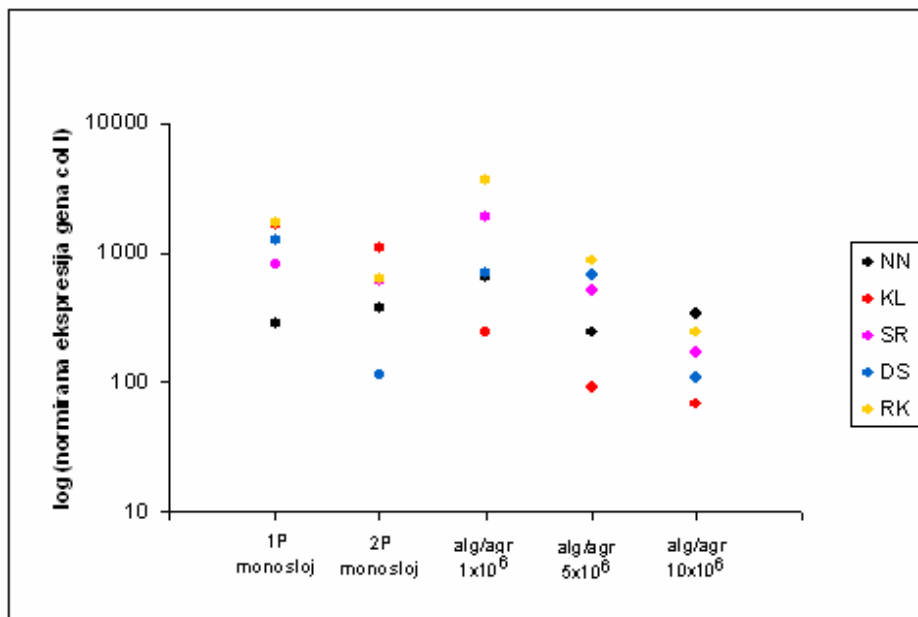
Hondrocite smo 14 dni gojili v tridimenzionalnem okolju gela iz alginata in agaroze (poglavje 3.2.5). Celice smo na tri dni dohranjevali z gojilnim medijem, ki je vseboval 15 % humanega seruma (poglavje 3.2.6). Po 14-ih dneh smo hondrocite lizirali s pomočjo lizirajočega pufra, izolirali celotno celično RNA in jo prepisali v cDNA (poglavje 3.2.7, 3.4.2, 3.4.3). Izražanje genov smo analizirali z metodo verižnega pomnoževanja v realnem času (poglavje 3.4.4). Zanimalo nas je izražanje genov, specifičnih za hialino sklepno hrustančno tkivo (kolagen II (*col II*) in agrekan (*agr*)), ter genov, specifičnih za dediferencirane hondrocite (kolagen I (*col I*) in verzikan (*ver*)). Rezultate meritev smo vrednotili s pomočjo programov SDS 2.1 in MS Excel. Na koncu smo jih še statistično vrednotili (poglavje 3.5).

Pričakovali smo, da bosta gena, ki kodirata kolagen II in agrekan, med prehodom iz prve v drugo pasažo enoslojne kulture imela znižan nivo izražanja (dediferenciacija), med gojenjem v gelu pa zvišan nivo izražanja (rediferenciacija). Po drugi strani smo pričakovali, da gena, ki kodirata kolagen I in verzikan, med prehodom iz prve v drugo pasažo enoslojne kulture, zvišata izražanje (dediferenciacija), med gojenjem v diskah iz gela pa ga znižata (rediferenciacija).

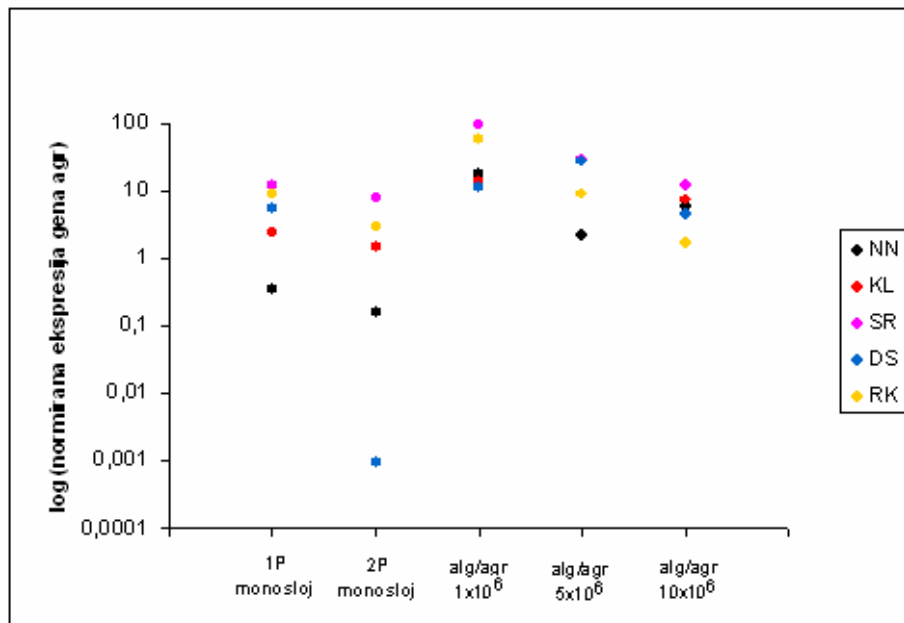
Izražanje genov za izbrane komponente izvenceličnega matriksa je bilo pri petih osebkih, ki smo jih analizirali, zelo različno (Priloga A, Slika 7, Slika 8, Slika 9 in Slika 10). Izražanje gena za kolagen II se je pri posameznih vzorcih razlikovalo do 66-krat (vzorca ŠR in NN v primerjavi z vzorcem DS). Izražanje gena za kolagen I se med posameznimi vzorci razlikovalo do 14-krat (vzorec RK v primerjavi z vzorcem KL), za agrekan do 8-krat (vzorec DS v primerjavi z vzorcem ŠR), za verzikan pa do 10-krat (vzorec DS v primerjavi z vzorcem KL). Največjo spremenljivost v izražanju vseh izbranih genov smo opazili pri vzorcih hondrocitov, nasajenih v gel pri koncentracijah $1 \times 10^6/\text{ml}$ in $5 \times 10^6/\text{ml}$. Pri vseh vzorcih smo opazili enak trend spreminjanja izražanja genov pri posameznih eksperimentalnih pogojih, nivo izražanja se pa pri posameznikih bistveno razlikuje.



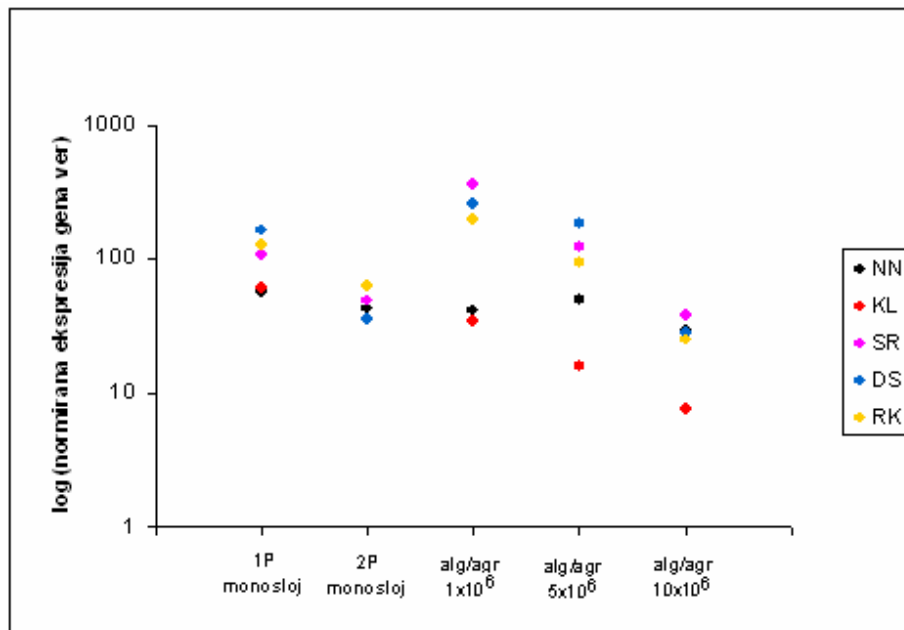
Slika 7: Nivo izražanja gena *col II* v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.



Slika 8: Nivo izražanja gena *col I* v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.



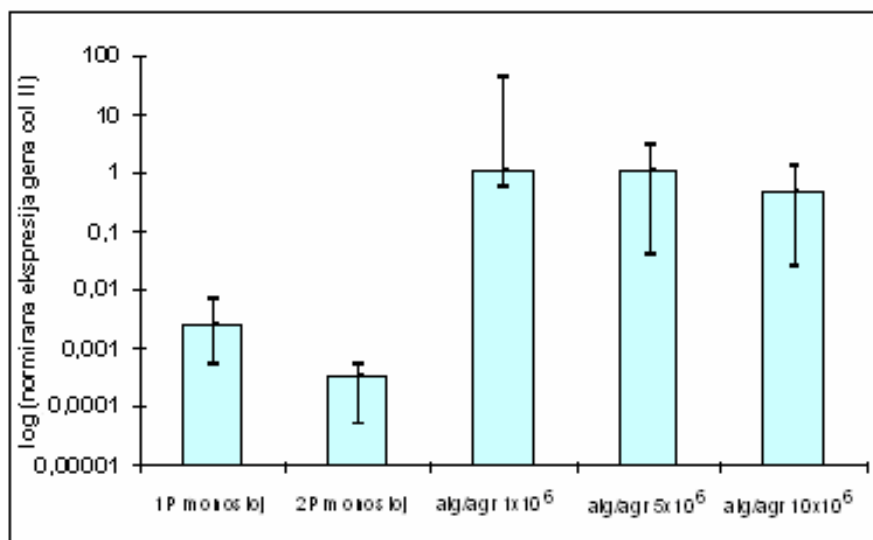
Slika 9: Nivo izražanja gena *agr* v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.



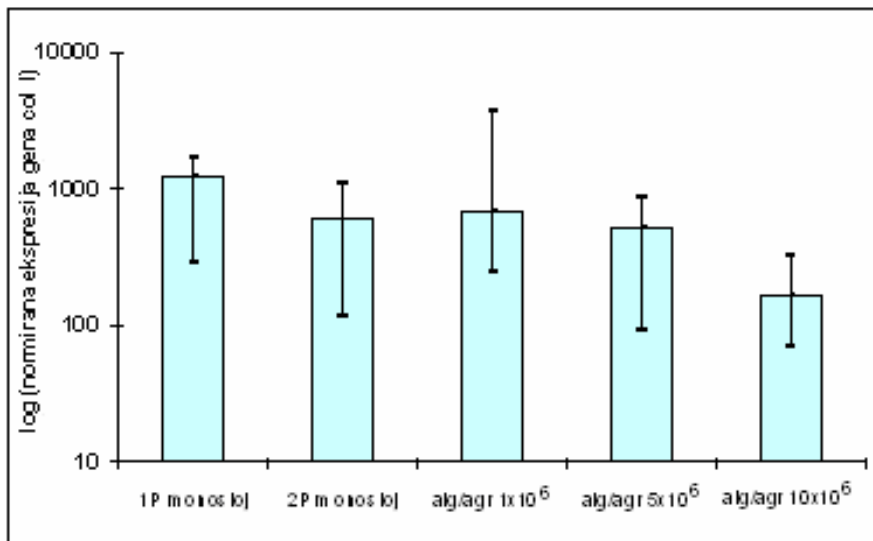
Slika 10: Nivo izražanja gena *ver* v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu.

Srednje vrednosti (mediane) nivoja izražanja posameznih genov so prikazane na Slikah 11–14 ter v Prilogi B. Nivo izražanja gena za kolagen II je bilo med gojenjem v enoslojni kulturi zanemarljivo. Po nasaditvi hondrocitov v diske iz gela se je nivo izražanja gena bistveno povečal (500-krat v primerjavi z enoslojno kulturo prve pasaže, 3500-krat v

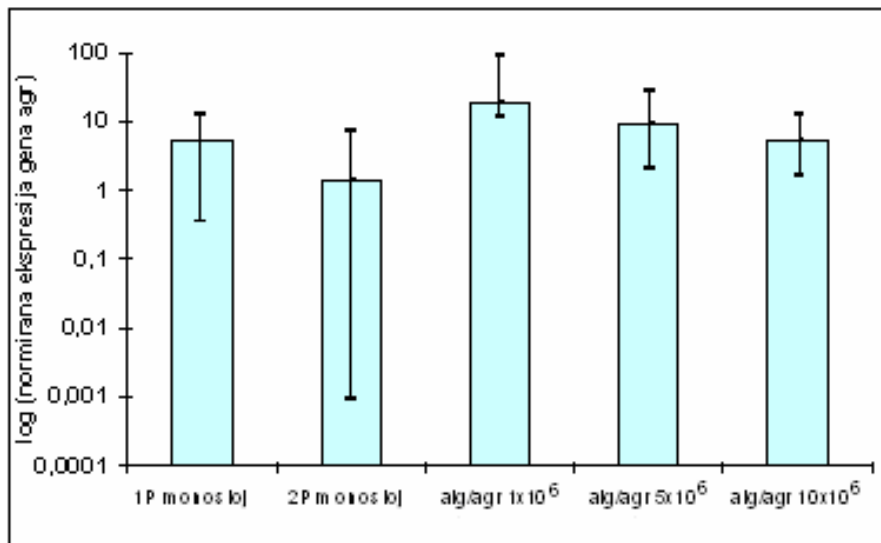
primerjavi z enoslojno kulturo druge pasaže). Pri diskih s koncentracijo celic 1×10^6 /ml in 5×10^6 /ml je bil nivo izražanja skoraj enak, pri koncentraciji 10×10^7 celic/ml pa 2,3-krat nižji. Gen, ki kodira kolagen I, je bil najbolj izražen v enoslojni kulturi prve pasaže. Njegov nivo izražanja v enoslojni kulturi druge pasaže pade za faktor 2, med gojenjem v gelu s koncentracijo celic 1×10^6 pa spet narašča za faktor 1,1. Nivo izražanja gena *col I* je bil najnižji v gelu s koncentracijo celic 10×10^6 /ml, kar je 7,4-krat nižje kot v enoslojni kulturi prve pasaže in 4-krat nižje kot v gelu z najnižjo koncentracijo celic. Nivo izražanja gena *agr* se je med preходом iz enoslojne kulture prve pasaže v enoslojno kulturo druge pasaže znižal za faktor 3,7. V gelu s koncentracijo celic 1×10^6 /ml se je njegov nivo izražanja povečal 12-krat v primerjavi z enoslojno kulturo druge pasaže (3,3-krat v primerjavi z enoslojno kulturo prve pasaže). Z naraščajočo koncentracijo celic v gelu je nivo izražanja gena *agr* upadal in je njegova najnižja vrednost bila 3-krat nižja kot pri najvišji koncentraciji celic v gelu, čeprav še vedno višja od nivoja izražanja v enoslojni kulturi. Nivo izražanja gena, ki kodira verzikan, je kazal podoben trend – 2,2-kratno znižanje nivoja izražanja med preходом iz prve v drugo pasažo enoslojne kulture, potem 4-kratno povečanje med gojenjem v gelu z 1×10^6 celic/ml in 2-kratno oz. 6,8-kratno upadanje nivoja izražanja pri gelih z višjimi koncentracijami celic. Razlika je, da se nivo izražanja gena *ver* pri gelu z najvišjo koncentracijo celic spustil celo pod nivo izražanja gena v enoslojni kulturi prve pasaže (za faktor 3,77).



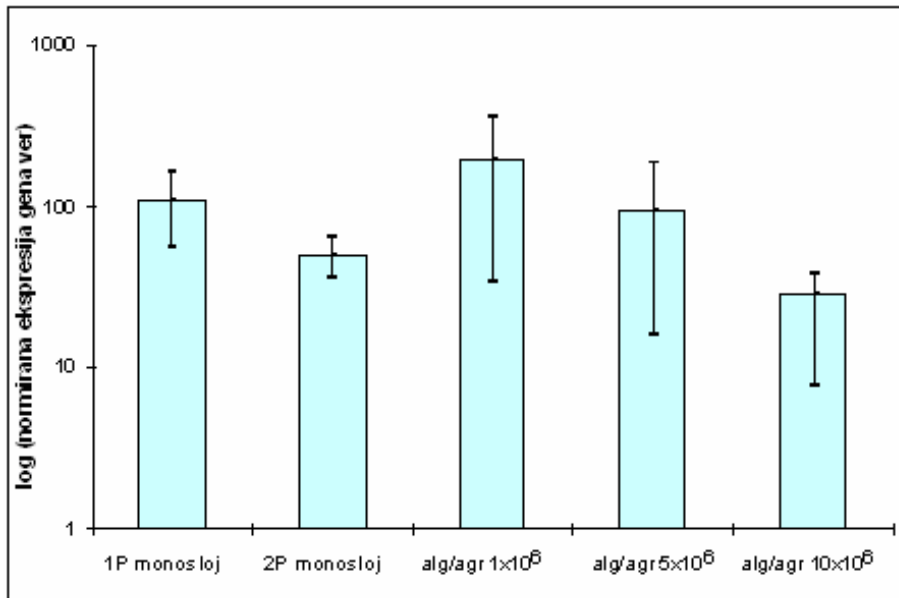
Slika 11: Srednja vrednost (mediana) nivoja izražanja gena *col II* v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu. Prikazane so mediana, minimalna in maksimalna vrednost petih podatkov za posamezne eksperimentalne pogoje.



Slika 12: Srednja vrednost (mediana) nivoja izražanja gena *col I* v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu. Prikazane so mediana, minimalna in maksimalna vrednost petih podatkov za posamezne eksperimentalne pogoje.

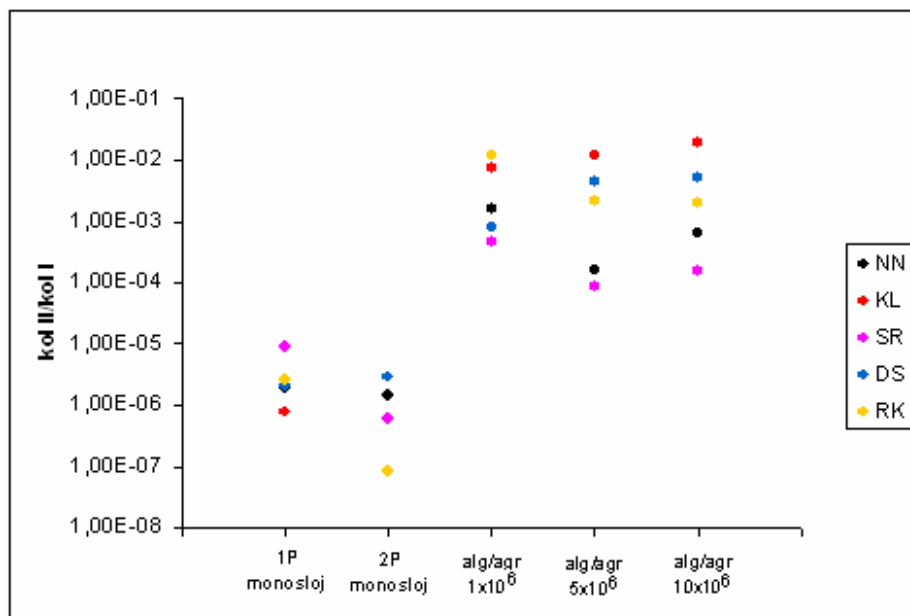


Slika 13: Srednja vrednost (mediana) nivoja izražanja gena *agr* v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu. Prikazane so mediana, minimalna in maksimalna vrednost petih podatkov za posamezne eksperimentalne pogoje.

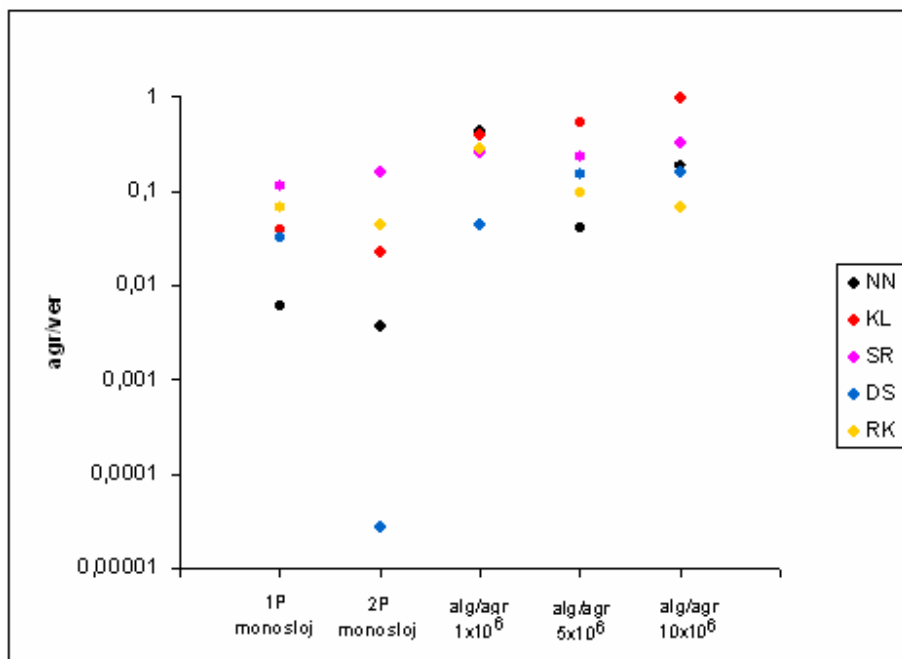


Slika 14: Srednja vrednost (mediana) nivoja izražanja gena *ver* v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže ter v diskih z različno koncentracijo celic v gelu. Prikazane so mediana, minimalna in maksimalna vrednost petih podatkov za posamezne eksperimentalne pogoje.

Vrednosti diferenciacijskih indeksov kol II/kol I in agr/*ver* prikazujeta Sliki 15 in 16 ter Priloga A. Zaradi spremenljivosti izražanja genov med posameznimi vzorci so se tudi njihove vrednosti precej razlikujejo. Trend spreminjanja vrednosti je bil enak pri vseh vzorcih, razen pri vrednosti indeksa agr/*ver* gelov bolnika KL s 5×10^6 celic/ml in 10×10^6 celic/ml.

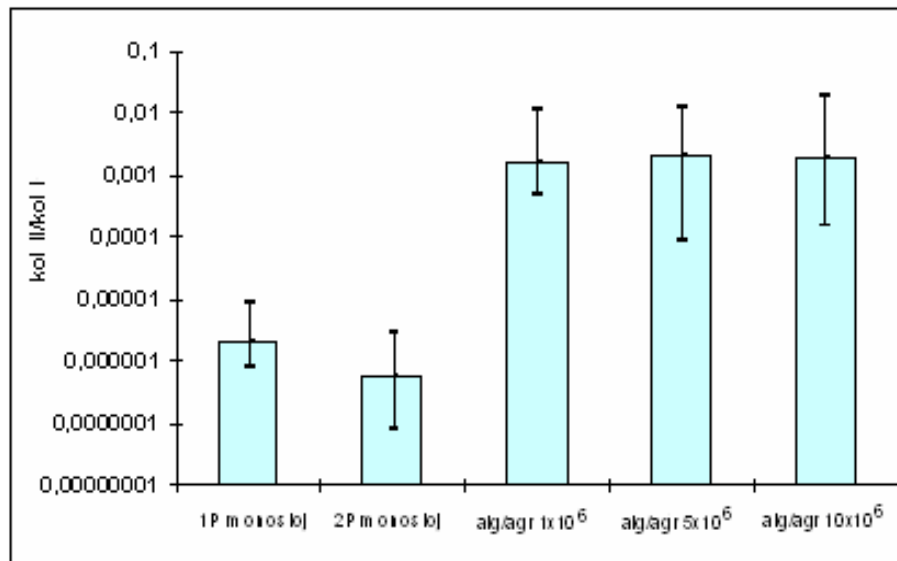


Slika 15: Diferenciacijski indeks kol II/kol I, izračunan za vzorce enoslojnih kultur prve in druge pasaže ter diske z različno koncentracijo celic.

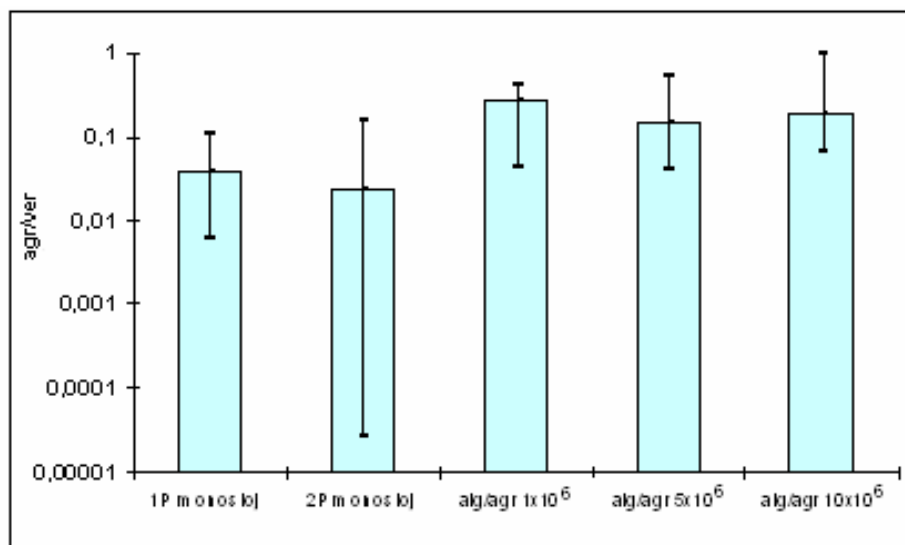


Slika 16: Diferenciacijski indeks agr/ver, izračunan za vzorce enoslojnih kultur prve in druge pasaže ter diske z različno koncentracijo celic

Srednje vrednosti (mediane) diferenciacijskih indeksov prikazujeta Sliki 17 in 18 ter Priloga B. Vrednost diferenciacijskega indeksa kol II/kol I enoslojnih kultur prve in druge pasaže je bila zelo nizka ($2,1 \times 10^{-6}$ oz. $5,7 \times 10^{-7}$). V tridimenzionalnih kulturah s koncentracijo celic 1×10^6 je indeks narasel za faktor 2842, v kulturah s koncentracijo celic 5×10^6 za faktor 3543, v kulturah s koncentracijo celic 10×10^6 pa za faktor 3421. Vrednost diferenciacijskega indeksa agr/ver v enoslojnih kulturah kaže enak trend spremembe kot indeks kol II/kol I – padec vrednosti ob prehodu iz prve v drugo pasažo. Padec vrednosti je bil v primeru indeksa agr/ver dvakrat manjši (faktor 1,8 v primerjavi s faktorjem 3,6 indeksa kol II/ kol I). Vrednost diferenciacijskega indeksa agr/ver v tridimenzionalni kulturi z najnižjo koncentracijo celic narašča 12,6-krat, v kulturah z višjo koncentracijo celic pade do vrednosti, ki je 1,5-krat nižja od najvišje.



Slika 17: Srednje vrednosti (mediane) diferenciacijskih indeksov kol II/kol I pri vzorcih enoslojnih kultur prve in druge pasaže ter diskov z različno koncentracijo celic. Prikazane so mediana, minimalna in maksimalna vrednost petih podatkov za posamezne eksperimentalne pogoje.



Slika 18: Srednje vrednosti (mediane) diferenciacijskih indeksov agr/ver pri vzorcih enoslojnih kultur prve in druge pasaže ter diskov z različno koncentracijo celic. Prikazane so mediana, minimalna in maksimalna vrednost petih podatkov za posamezne eksperimentalne pogoje.

Rezultati statističnih analiz podatkov so prikazani v Prilogi C. Razlika med izražanjem gena *col II* je statistično značilna med enoslojno kulturo druge pasaže in vsemi tremi koncentracijami celic v gelu. Izražanje gena *col I* je signifikantno različno med enoslojno kulturo druge pasaže in gela z najvišjo koncentracijo celic ter med geli s koncentracijo celic 1×10^6 in 10×10^6 /ml. Dokazali smo statistično značilne razlike med izražanjem gena *agr* med enoslojno kulturo druge pasaže in geli z 1×10^6 ter 5×10^6 celic/ml. Statistično je značilna tudi razlika med izražanjem gena *ver* v enoslojni kulturi druge pasaže in gela s

koncentracijo celic 10×10^6 /ml, med posameznimi geli pa je razlika značilna med koncentracijami 10×10^6 celic/ml in 5×10^6 celic/ml ter 10×10^6 /ml in 1×10^6 /ml.

Razlike med diferenciacijskimi indeksi, ki smo jih izračunali iz normaliziranih vrednosti izražanja posameznih značilnih genov, so pri obeh indeksih statistično značilne le med enoslojnimi kulturami druge pasaže in geli z različnimi koncentracijami celic. Med geli z različnimi koncentracijami celic nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 ŽIVOST CELIC V DISKIH IZ GELA

Hondrocite smo po namnoževanju v enoslojni kulturi prve pasaže nasadili v treh različnih koncentracijah v gele, pripravljene iz mešanice alginata in agaroze. Hondrocite smo v tridimenzionalnih kulturah gojili 14 dni in potem analizirali njihovo živost in fenotipske lastnosti. Živost celic smo določali kvalitativno s pomočjo diferencialnega barvanja, in sicer z dvema metodama: barvilom MTT (Slika 5) in kombinacijo fluorescenčnih barvil fluorescein diacetata in propidijevega jodida (Slika 6).

Z obema metodama za kvalitativno določanje živosti hondrocitov v diskih iz gela smo lahko ugotovili, da je odstotek živih celic v diskih zelo visok. Ocenjujemo, da je živost v vseh primerih večja od 95%. Debelina diskov (približno 3 milimetre) očitno ni predstavljala ovire za prosto difuzijo hranil in kisika do hondrocitov v osrednjem delu diskov. Prisotnost manjšega števila mrtvih celic je normalen pojav pri vsakem postopku, ki vključuje presajanje izredno občutljivih evkariontskih celic iz enega okolja v drugo.

Razlike v uspešnosti obeh uporabljenih metod pri določanju približnega odstotka živih oz. mrtvih celic so lahko posledica slabšega prehajanja barvila MTT v gel v primerjavi s fluorescenčnimi barvili. Drug možen vzrok za razlike med metodama barvanja je tudi nestandardizirana debelina rezin gelov. Posledica tega so neenakomerno pobarvane rezine, iz katerih težko ugotovimo natančen odstotek živih celic. Za natančnejše določanje odstotka živih celic v diskih iz gela bi morali debelino diskov standardizirati in iz reprezentativnega števila pobarvanih rezin posameznega diska določiti natančno število živih in mrtvih celic, ali pri določanju uporabiti drugo metodo.

5.2 FENOTIPSE LASTNOSTI HONDROCITOV, GOJENIH V ENOSLOJNIH IN TRIDIMENZIONALNIH KULTURAH

Fenotipske lastnosti hondrocitov, gojenih v tridimenzionalnem nosilcu iz mešanice alginata in agaroze, smo analizirali po 14-ih dneh gojenja, saj naj bi ta čas zadostoval, da pride do procesa rediferenciacije (Gaissmaier in sod., 2005). Na fenotipske lastnosti hondrocitov smo sklepali na osnovi morfologije celic med rastjo v enoslojnih in tridimenzionalnih kulturah ter podatkov o izražanju genov, specifičnih za hialini sklepni (kolagen II in agrekan) oz. fibrozni (kolagen I, verzikan) tip hrustančnega tkiva. Čeprav izražanje genov ni neposreden pokazatelj količine nastalih proteinov, pokaže spremembe, ki se dogajajo na nivoju mRNA. Izražanje genov smo določili s pomočjo metode verižnega pomnoževanja v realnem času (RT-PCR). Spremembe v fenotipu hondrocitov so pokazatelj stopnje dediferenciacije in obratnega procesa – rediferenciacije hondrocitov med gojenjem.

Hondrocite v sodobni medicini uporabljamo za zdravljenje različnih mehanskih poškodb sklepov. V prihodnosti naj bi jih uporabljali tudi za zdravljenje različnih bolezenskih stanj hrustanca. Rutinsko se že uporablja metoda avtologne implantacije hondrocitov (Darling in Athanasiou., 2004; Ruano-Ravina in Diaz, 2006). Za potrebe kirurških posegov in za potrebe raziskav na področju tkivnega inženirstva hrustančnega tkiva hondrocite gojimo v enoslojnih kulturah (poglavje 2.3.1). V enoslojnih kulturah hondrocite dohranjujemo z gojilnim medijem, ki vsebuje humani serum in omogoča hitro delitev celic. Ko celice prenesemo v laboratorijske pogoje in stimuliramo njihovo delitev, se pritrdijo na površino gojilne posode in izgubijo specifično morfologijo (Strehl in sod., 2002). Molekularni mehanizmi dediferenciacije hondrocitov niso pojasnjeni, ker vključujejo aktivnost velikega števila genov in so izredno kompleksni (Haudenschild in sod., 2001).

Ker je uspešnost zdravljenja hrustančnega tkiva odvisna od fenotipa celic, ki jih vnesemo v poškodovano mesto, je živost in izražanje specifičnih genov ključnega pomena pri pripravi tkivno-inženirskih pripravkov iz hondrocitov. Želimo namreč, da je novo tkivo čim bolj podobno hialinemu sklepnemu hrustančnemu tkivu. Pripravo hondrocitov za cellično terapijo otežuje pojav dediferenciacije. Tudi v naši raziskavi smo dokazali ta pojav. Hondrociti so med gojenjem v enoslojnih kulturah spremenili morfologijo iz okrogle v podolgovato (Slika 3). Izražanje gena, ki kodira poglavitno sestavno komponento izvenceličnega matriksa hialinega tipa hrustančnega tkiva, kolagen II, je bilo med gojenjem v enoslojnih kulturah zelo nizko in še dodatno upadalo med prehodom iz prve v drugo pasažo (Priloga B, Slika 11). Izražanje gena *col I* je bilo najvišje ravno pri enoslojnih kulturah (Priloga B, Slika 12). Diferencijski indeks kol II/kol I je v obeh pasažah izredno nizek in dokazuje visoko stopnjo izgube specifičnega hrustančnega sklepnega fenotipa (Priloga B, Slika 17). Druga specifična sestavna komponenta izvenceličnega matriksa hondrocitov sklepnega hrustanca je proteoglikan agrekan. Nivo izražanja gena, ki kodira njegovo sintezo, je bil v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže veliko nižji kot v tridimenzionalnih kulturah. Tudi med pasažami enoslojnih kultur se razlikoval – upadal je med prehodom iz prve v drugo pasažo (Priloga B, Slika 13). Nivo izražanja gena, ki kodira verzikan, je kazal podoben trend – znižanje med prehodom iz prve v drugo pasažo enoslojne kulture (Priloga B, Slika 14). Diferencijski indeks agr/ver je prav tako najnižji v primerih enoslojnih kultur prve in druge pasaže (Priloga B, Slika 18). Trend utišanja genov, specifičnih za sklepni tip hrustanca in povečanega izražanja

genov specifičnih za vezivni tip hrustanca ter nizka vrednost obeh diferenciacijskih indeksov pri enoslojnih kulturah hondrocitov dokazuje dediferenciacijo hondrocitov med gojenjem v enoslojnih kulturah (Tallheden in sod., 2004).

Številni avtorji (Benya in Shaffer, 1982; Bonaventure in sod., 1994; Chubinskaya in sod., 2001; Tallheden in sod., 2004) opisujejo tudi pojav rediferenciacije, to je povrnitev specifičnega fenotipa po nasaditvi hondrocitov v tridimenzionalno okolje, ki je bolj podobno njihovemu naravnemu okolju (opisano v poglavju 2.3.2). Tudi v tej diplomski nalogi smo dokazali pravilnost te trditve. Morfologija hondrocitov se je po nasajevanju hondrocitov iz enoslojne kulture prve pasaže v diske iz gela spremenila iz podolgovate nazaj v okroglo obliko (Slika 4). Dodatna potrditev procesa je bila tudi sprememba v izražanju specifičnih genov. Izražanje genov *col II* in *agr*, specifičnih za sklepni tip hrustančnega tkiva, se je povečalo, izražanje genov *col I* in *ver*, specifičnih za dediferencirano obliko hrustanca, pa znižalo. Oba diferenciacijska indeksa kažeta precejšnje povečanje v primerjavi z enoslojnimi kulturami (Priloga B, Slika 11, Slika 12). Visoke vrednosti obeh diferenciacijskih indeksov v tridimenzionalnih kulturah glede na primerjavo z enoslojnimi kulturami, dokazuje rediferenciacijsko sposobnost hondrocitov v tridimenzionalnem okolju gela. Opazna je večja sprememba v primeru diferenciacijskega indeksa kol II/kol I kot pri *agr/ver*. Očitno je, da mešanica iz alginata in agaroze predstavlja ustrezno okolje za povrnitev sklepnega fenotipa hrustančnim celicam.

V literaturi navajajo različne rezultate določanja optimalne koncentracije hondrocitov v tridimenzionalnih pripravkih. Ponekod je opisana visoka stopnja izražanja *col II* in *agr* pri nižji koncentraciji – okrog 10^4 celic/ml (Haudenschild in sod, 2001; Lee in sod., 2003), v drugi študiji pa najdemo podatek o izboljšanju fenotipa celic pri 5×10^6 celic/ml (Heywood in sod., 2004). Ker je koncentracija hondrocitov v hrustančnem tkivu približno 14×10^6 celic/ml (Hollister, 2005), smo pričakovali, da bo najvišja testirana koncentracija celic v gelu najbolj ustrezna za izražanje specifičnih genov. Te predpostavke v nalogi nismo uspeli dokazati. Statistično pomembne razlike so se pokazale le med enoslojno kulturo druge pasaže in diskov iz gela (Priloga C). Diferenciacijski indeksi kol II/kol I in *agr/ver* se med posameznimi koncentracijami hondrocitov v diskih ne razlikujejo statistično značilno. Razlogi za to so lahko različni. Najpomembnejši je verjetno premajhno število vzorcev in izredno velika biološka spremenljivost v izražanju posameznih genov pri različnih vzorcih. Kot je prikazano v Prilogi A in Slikah 1-4, se izražanje genov *col II*, *col I*, *agr* in *ver* precej razlikuje med posamezniki. Spremenljivost je lahko posledica različne starosti bolnikov (26 do 40 let), ki pogojuje različno zastopanost posameznih komponent izvenceličnega matriksa v celotnem volumnu pripravka (Giannoni in Cancedda, 2006). Kot je opisano v poglavju 2.1.4, biološko spremenljivost izražanja genov, ki kodirajo sestavne komponente izvenceličnega matriksa šele raziskujejo. Drug možen razlog za veliko spremenljivost v izražanju genov *in vitro* je vpliv sestave gojišča na hondrocite. Gojišča, ki jih uporabljamo za dohranjevanje hondrocitov, niso standardizirana, ker ne poznamo natančno potrebe hondrocitov po hranilih in rastnih faktorjih. Spodbujanje hondrocitov h hitrim delitvam s serumskimi gojišči je lahko vzrok spremenjenega vzorca izražanja genov za sintezo komponent izvenceličnega matriksa, ki se sintetizira in izloča med v tem primeru nenaravno kratko interfazo. Optimalna naj bi bila uporaba dveh različnih gojilnih medijev: medija z dodatkom humanega seruma v fazi namnoževanja celic in medija z elektroliti in brez dodanega seruma v fazah diferenciacije in vzdrževanja diferenciranega stanja celic

(Strehl in sod., 2002). Ker vpliv medija brez dodatka seruma ni dovolj preučen, smo se v nalogi odločili za uporabo gojilnega medija z dodatkom humanega seruma. Odzivnost hondrocitov na posamezne sestavine gojišča se spreminja s staranjem in je odvisna od faze celičnega cikla, v katerem se celica nahaja (Strehl in sod., 2002). Ker so v nalogi uporabljeni vzorci petih različno starih bolnikov, je možno, da je bila odzivnost posameznega vzorca na serum in druge komponente gojilnega medija različna. Hrustančno tkivo je organizirano po conah, zato je možno, da odstotek celic iz posamezne cone vpliva na končni profil izražanja genov (Darling in Athanasiou, 2005). Ker hondrociti v različnih conah tkiva proizvajajo in izločajo izvencelični matriks z različno sestavo, globina biopsije in odstotek hondrocitov iz posameznih con po izolaciji posameznih celic verjetno bistveno vplivajo na nadaljnje izražanje genov. Zelo verjetno je tudi, da hondrociti za optimalno izražanje specifičnih genov zahtevajo mehanske dražljaje, ki so prisotni v naravnem okolju hondrocitov (Giannoni in Cancedda, 2006). Ker nismo dokazali statistično značilne razlike med kvaliteto izvenceličnega matriksa pri različnih koncentracijah hondrocitov v gelu iz alginata in agaroze, lahko sklepamo, da bi med testiranimi koncentracijami za uporabo pri pripravi tkivno-inženirskega pripravka uporabnega v avtologni implantaciji hondrocitov bila uporabna koncentracija 10^6 celic/ml. Prednost uporabe najnižjega testiranega števila hondrocitov v pripravkih bi bila hitrost pridobivanja zadostnega števila celic, kar bi metodo tudi pocenilo. Postopek odvzema biopsijskega vzorca hrustančnega tkiva bi bil lahko manj invaziven, ker bi uspešnost zdravljenja zagotovilo že manjše število celic.

Gel iz alginata in agaroze, ki smo ga uporabili v nalogi, se je pokazal kot ustrezen nosilec za pripravo konstruktov v tkivnem inženirstvu hrustančnega tkiva. Omogoča rediferenciacijo predhodno dediferenciranih hondrocitov in zato predstavlja napredek v razvoju metode avtologne implantacije hondrocitov. Celice si v gelu hitro povrnejo specifičen fenotip in zato potrebujejo po implantaciji na mestu poškodbe manj časa za popolno rediferenciacijo. Dodatno prednost predstavlja tudi poltrdno agregatno stanje gela, s katerim v primerjavi s suspenzijsko kulturo lažje rokujemo.

V prihodnosti bo potrebno najprej standardizirati postopke odvzema biopsije, sestave gojilnih medijev v posameznih fazah gojenja hondrocitov, časa gojenja v posamezni fazi namnoževanja, predvsem upoštevajoč biološko spremenljivost, ki obstaja na nivoju posameznika. Glede na različno hitrost rasti hondrocitov med posamezniki je možno tudi, da bo potrebno individualizirati čas gojenja in sestavo gojilnega medija glede na specifičen vzorec izražanja značilnih genov (Strehl in sod., 2002; Tallheden in sod., 2004). Šele ko izključimo vpliv zunanjih dejavnikov, lahko bolj natančno določimo vplive koncentracije celic v kulturi na izražanje specifičnega fenotipa. V študijo je potrebno vključiti veliko večje število posameznikov in če je možno, izključiti vpliv dejavnika starosti z vključevanjem le podobno starih posameznikov.

5.3 SKLEPI

- S pomočjo kvalitativnega določanja živosti celic v diskih iz gela smo pri vseh treh koncentracijah celic dokazali visok odstotek preživetja celic po 14 dnevih gojenja.
- Z opazovanjem spremembe morfologije hondrocitov med gojenjem v enoslojnih kulturah ter tridimenzionalnih kulturah iz gela, smo dokazali spremembo morfologije iz dediferencirane v rediferencirano obliko.
- Z analizo izražanja genov specifičnih za hialini in vezivni tip hrustančnega tkiva smo dokazali dediferenciacijo hondrocitov v enoslojnih kulturah in rediferenciacijo v tridimenzionalnih kulturah.
- Dokazali smo statistično značilno razliko med diferenciacijskimi indeksi kol II/kol I in agr/ver, ki sta pokazatelja stopnje dediferenciacije in rediferenciacije celic, po gojenju v enoslojnih oz. tridimenzionalnih kulturah.
- Razlika med posameznimi testiranimi koncentracijami hondrocitov v tridimenzionalnih kulturah se je pokazala statistično neznačilna, t.j. nismo dokazali statistično značilne razlike med izražanjem izbranih genov pri posameznih koncentracijah hondrocitov v gelu.
- V prihodnosti bo potrebna natančnejša definicija vplivov posameznih dejavnikov okolja (razlik med posamezniki, vpliva sestavin gojišča, vpliv faze celičnega cikla...) in vključevanje večjega števila osebkov v študijo vpliva koncentracije celic na fenotip hondrocitov

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo želeli določiti optimalno koncentracijo hondrocitov v tridimenzionalni kulturi iz mešanice alginata in agaroze, ki omogoča najustreznejše izražanje genov, specifičnih za hialini sklepni hrustanec. Poskus smo opravili na vzorcih sklepnega hrustančnega tkiva petih bolnikov. Hondrocite smo izolirali z mehansko in encimsko razgradnjo iz biopsijskega vzorca tkiva. Izolirane hondrocite smo gojili v enoslojni kulturi do prve pasaže. Ko je bila dosežena 100 % konfluenca, smo enoslojno kulturo celice nasadili v enoslojno kulturo druge pasaže ter v treh različnih koncentracijah ($1 \times 10^6/\text{ml}$, $5 \times 10^6/\text{ml}$ in $10 \times 10^6/\text{ml}$) v diske iz mešanice alginata in agaroze. Hondrocite smo gojili 14 dni v gojilnem mediju z dodatkom 15 % humanega seruma. Po končani inkubaciji smo rezine diskov barvali z dvema metodama za določanje živosti celic – z barvilom MTT in s kombinacijo fluorescenčnih barvil (fluorescein diacetat in propidijev jodid) s pomočjo invertnega oziroma fluorescenčnega mikroskopa kvalitativno določili živost celic. Po gojenju hondrocitov smo analizirali tudi izražanje genov, specifičnih za hialini sklepni hrustanec (*col II*, *agr*) ter vezivni hrustanec (*col I*, *ver*). Iz celic smo izolirali celotno RNA, jo prepisali v cDNA in analizirali izražanje genov z metodo verižnega pomnoževanja v realnem času (RT-PCR). Rezultate smo statistično vrednotili in določili statistično značilnost razlik v nivojih izražanja genov. Morfologija hondrocitov se je med gojenjem v enoslojnih kulturah spremenila iz okrogle v podolgovato fibroblastno, kar kaže na proces dediferenciacije. Po nasaditvi dediferenciranih celic v tridimenzionalno okolje, pripravljeno iz gela, je prišlo do spremembe nazaj v okroglo morfologijo, kar kaže na proces rediferenciacije hondrocitov. Živost celic v diskih iz gela je bila visoka ne glede na koncentracijo celic v disku, kar kaže, da je gel optimalno okolje za rast in rediferenciacijo hondrocitov v postopku priprave pripravkov, uporabnih v tkivnem inženirstvu. Dediferenciacijo in rediferenciacijo hondrocitov smo dokazali tudi z ugotavljanjem razlik v nivojih izražanja specifičnih genov. Izražanje genov smo izrazili v obliki diferenciacijskih indeksov kol II/kol I in agr/ver. Oba indeksa prikazujeta podoben trend spremembe med poskusom – upad vrednosti med gojenjem v enoslojnih kulturah prve in druge pasaže in značilno rast po 14-dnevnem gojenju v tridimenzionalnih kulturah. Optimalne koncentracije hondrocitov v tkivnem konstrukt nam ni uspelo dokazati, izražanje genov se med diski s posameznimi koncentracijami celic ne razlikuje statistično značilno. Možno je, da je na poskus vplivala velika biološka spremenljivost med vzorci posameznih bolnikov. Tudi število vzorcev je precej nizko. Ker proces dediferenciacije in rediferenciacije hondrocitov med gojenjem v pogojih *in vitro* še vedno slabo razumemo, je možno tudi, da je na rezultate vplivala globina biopsije, sestava gojilnega medija in prisotnost humanega seruma. Zaradi velikega števila zunanjih dejavnikov, vpliv na hondrocite, katerih ne poznamo dovolj natančno, bo v prihodnosti potrebno standardizirati postopke odvzema biopsije, sestavo gojilnega medija v posameznih fazah gojenja hondrocitov, čas gojenja v posamezni fazi namnoževanja, predvsem upoštevajoč biološko spremenljivost, ki obstaja na nivoju posameznika. Potem lahko ponovimo poskus z bolj natančno definiranimi spremenljivkami in večjim številom vzorcev. V nalogi smo dokazali ustreznost gela iz mešanice alginata in agaroze v pripravi konstruktov iz hondrocitov. Hondrociti v gelu ohranijo specifičen hondrocitni fenotip – morfologijo celic, pospešeno izražanje specifičnih genov in znižan nivo izražanja nespecifičnih genov. Zato predstavlja napredek v razvoju metode avtologne implantacije hondrocitov. Potrebne pa so številne dodatne optimizacije postopka.

7 VIRI

Benya P. D., Scaffer J. D. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30: 215-224.

Bilgen B., Chang-Mateu I. M., Barabino G. A. 2005. Characterization of mixing in a novel wavy-walled bioreactor for tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 92, 7: 907-919.

Binette F., McQuaid D. P., Haundenschild D. R., Yaeger P. C., McPherson J. M., Tubo R. 1998. Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, 16, 2: 207-216.

Bonaventure J., Kadhom N., Cohen-Solal L., Ng K. H., Bourguignon J., Lasselin C., Freisinger P. 1994. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Experimental Cell Research*, 212: 97-104.

Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New England Journal of Medicine*, 331, 14: 889-895.

Brittberg M., Tallheden T., Sjögren-Jansson B., Lindahl A., Peterson L. 2001. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 391: 337-348.

Cherubino P., Grassi F. A., Bulgheroni P., Ronga M. 2003. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *Journal of Orthopedic Surgery Hong Kong*, 11, 1: 10-15.

Chubinskaya S., Huch K., Schulze M., Otten L., Aydelotte M., Cole A. 2001. Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49, 10: 1211-1219.

Darling E. M., Athanasiou K. A. 2005. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 425-432-

Finger F., Schörle C., Zien A., Gebhard P., Goldring M. B., Aigner T. 2003. Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis and Rheumatism*, 48, 12: 3395-3403.

Gaissmaier C., Fritz J., Krackhardt T., Flesch I., Aicher W. K., Ashammakhi N. 2005. Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials*, 26, 14: 1953-1960.

Giannoni P., Cancedda R. 2006. Articular chondrocyte culturing for cell-based cartilage repair: needs and perspectives. *Cells Tissues Organs*, 184: 1-15.

Gigante A., Bevilacqua C., Ricevuto A., Mattioli-Belmonte M., Greco F. 2007. Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 15, 1: 88-92.

Grodzinsky A. J., Levenston M. E., Jin M., Frank E. H. 2000. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2: 691-713.

Gründer T., Gaissmaier C., Fritz J., Stoop R., Hortschansky P., Mollenhauer J., Aicher W. 2004. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12: 559-567.

Guo J., Jourdian G. W., MacCallum D. K. 1989. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connective Tissue Research*, 19: 277-297.

Haudenschild D. R., McPherson J. M., Tubo R., Binette F. 2001. Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation. *Anatomical Record*, 263: 91-98.

Häuselmann H. J., Aydelotte M. B., Schumacher B. L., Kuettner K. E., Gitelis S. H., Thonar E. J.-M. A. 1992. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Martix*, 12: 116-129.

Heywood, H., Sembi P. K., Lee D., Bader D. 2004. Cellular utilization determines viability and matrix distribution profiles in chondrocyte-seeded alginate constructs. *Tissue Engineering*, 10, 9/10: 1467-1479.

Hollister S. J. 2005. Cartilage structure and function. Ann Arbor, College of Engineering, University of Michigan. (3. dec. 2005).
<http://www.engin.umich.edu/class/bme456/cartilage/cart.htm> (18. jul. 2007): 10 str.

Hutmacher D. W., Goh J. C. Teoh S. H. 2001. An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications. *Annals of the Academy of Medicine Singapore*, 30, 2: 183-191.

Junqueira L. C. U., Carneiro J. 2003. Basic histology: Text & atlas. 10th ed. New York, Lange Medical Books McGraw-Hill: 95-127, 135-140.

Knudson C. B., Knudson W. 2001. Cartilage proteoglycans. *Seminars in Cell Developmental Biology*, 12, 2: 69-78.

Kupchik H. Z., Langer R. S., Haberern C., el Deriny S., O'Brien M. 1983. A new method for the three-dimensional in vitro growth of human cancer cells. *Experimental Cell Research*, 147: 454-460.

Lee D.A., Reisler T., Bader D. 2003. Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 74, 1: 6-15.

Lin Z., Willers C., Xu J., Zheng M.-H. 2006. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Engineering*, 12, 7: 1971-1984.

Marlovits S., Hombauer M., Tamandl D., Vécsei V., Schlegel W. 2004. Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes in monolayer culture. *International Journal of Molecular Medicine*, 13: 281-287.

Martin I., Jakob M., Schäfer D., Dick W., Spagnoli G., Herber M. 2001. Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9: 112-118.

Nelson D. L., Cox M. M. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. New York, W. H. Freeman and Company: 1119 str.

Nolan T., Hands R. E., Bustin S. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1, 3: 1559-1582.

Ohlendorf C., Tomford W. W., Mankin H. J. 1996. Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 14, 3: 413-416.

Ragan P. M., Chin V. I., Hung H. K., Masuda K., Thonar E. J.-M. A., Arner E. C., Grodzinsky A. J., Sandy J. D. 2000. Chondrocyte extracellular matrix synthesis and turnover are influenced by static compression in a new alginate disk culture system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383, 2: 256-264.

Ruano-Ravina A., Diaz M. J. 2006. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14: 47-51.

Schulze-Tanzil G., de Souza P., Villegas Castrejon H., John T., Merker H. J., Scheid A., Shakibaei M. 2002. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell and Tissue Research*, 308, 3: 371-379.

Strehl R., Schumacher K., de Vries U., Minuth W. W. 2002. Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Engineering*, 8, 1: 37-42.

Tallheden T., Karlsson C., Brunner A., van der Lee J., Hagg R., Tommasini R., Lindahl A. 2004. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12: 525-535.

Vacanti C. A., Vacanti J. P. 2000. The science of tissue engineering. *Orthopedic Clinics of North America*, 31, 3: 351-355.

Vacanti J. P., Langer R. 1999. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Molecular Medicine*, 354: 32-34.

Wong M., Siegrist M., Wang X., Hunziker E. 2001. Development of mechanically stable alginate/chondrocyte constructs: effects of guluronic acid content and matrix synthesis. *Journal of Orthopaedic Research*, 19: 493-499.

Zhang Z., McCaffery J. M., Spencer R. G., Francomano C. A. 2004. Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultrastructural analysis in comparison with cartilage explants. *Journal of Anatomy*, 205, 3: 229-237.

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki ste mi s svojimi nasveti, vzpodbudami in navodili v praktičnem delu v laboratoriju pomagali pri opravljanju diplomske naloge:

dr. Ariana Barlič
dr. Elvira Maličev
prof. dr. Kristina Sepčič

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Mojci Narat.

PRILOGE

Priloga A: Normalizirane vrednosti izražanja izbranih genov pri petih vzorcih in različnih eksperimentalnih pogojih

	<i>kol II</i> norm	<i>kol I</i> norm	kol II/kol I	<i>agr</i> norm	<i>ver</i> norm	agr/ver
NN 1P monosloj	0,0005432	285,94605	1,90E-06	0,349981529	56,30908	0,006215366
NN 2P monosloj	0,0005293	371,05074	1,42645E-06	0,155272978	42,40304	0,003661836
NN 2P alg/agr 1x10 ⁶	1,0593951	654,8777	0,001617699	17,7657069	41,63289	0,426722918
NN 2P alg/agr 5x10 ⁶	0,0397058	247,25994	0,000160583	2,095706508	50,59762	0,041419071
NN 2P alg/agr 10x10 ⁶	0,2168236	332,87811	0,00065136	5,62133849	29,48687	0,19063871
KL 1P monosloj	0,0013132	1683,6846	7,80E-07	2,381016618	60,13319	0,039595712
KL 2P monosloj	9,16E-05	1082,2512	8,46E-08	1,421307967	62,76558	0,022644704
KL 2P alg/agr 1x10 ⁶	1,7433028	247,58682	0,007041178	13,33552474	33,93191	0,393008385
KL 2P alg/agr 5x10 ⁶	1,0878101	91,13496	0,011936254	8,760266077	16,12563	0,543251064
KL 2P alg/agr 10x10 ⁶	1,3210817	69,124594	0,019111602	7,44828455	7,62672	0,976603938
ŠR 1P monosloj	0,007251	814,34973	8,90408E-06	12,21610692	108,3301	0,112767442
ŠR 2P monosloj	0,0003429	597,72598	5,73615E-07	7,568189379	49,189	0,153859401
ŠR 2P alg/agr 1x10 ⁶	0,8665105	1870,6562	0,000463212	92,2965099	359,0517	0,25705634
ŠR 2P alg/agr 5x10 ⁶	0,0453133	517,0671	8,76353E-05	29,15649088	122,7306	0,237565048
ŠR 2P alg/agr 10x10 ⁶	0,025203	167,84744	0,000150154	12,24311014	38,19607	0,320533267
DS 1P monosloj	0,002599	1240,882	2,09448E-06	5,292970781	163,9419	0,032285653
DS 2P monosloj	0,0003361	116,61558	2,88194E-06	0,000958099	35,4052	2,7061E-05
DS 2P alg/agr 1x10 ⁶	0,5545931	681,29447	0,000814029	11,30727348	256,5014	0,044082703
DS 2P alg/agr 5x10 ⁶	2,9816671	663,18138	0,004496005	27,26658639	184,6025	0,147704327
DS 2P alg/agr 10x10 ⁶	0,5683944	109,64682	0,005183865	4,487519443	28,67875	0,156475425
RK 1P monosloj	0,0042506	1707,4069	2,49E-06	8,61775862	127,3525	0,06766856
RK 2P monosloj	5,34E-05	635,87348	8,40E-08	2,870194867	63,64972	0,0450936
RK 2P alg/agr 1x10 ⁶	41,110306	3603,5089	0,01140841	55,72186691	195,0514	0,285677833
RK 2P alg/agr 5x10 ⁶	1,7513977	867,25094	0,002019482	9,074075665	94,20954	0,096318017
RK 2P alg/agr 10x10 ⁶	0,4720248	242,32101	0,001947932	1,668158288	25,11947	0,066408973

Priloga B: Srednje vrednosti (mediane) nivejev izražanja izbranih genov pri petih vzorcih in različnih eksperimentalnih pogojih.

	Me (kol II)	Me (kol I)	Me (kol II/ kol I)	Me (agr)	Me (ver)	Me (agr)/ ver)
1P monosloj	0,0026	1240,9	2,0945E-06	5,2930	108,33	0,0396
2P monosloj	0,0003	597,73	5,7361E-07	1,4213	49,189	0,0226
alg/agr 1x10 ⁶	1,0594	681,29	1,6177E-03	17,766	195,05	0,2857
alg/agr 5x10 ⁶	1,0878	517,07	2,0195E-03	9,0741	94,210	0,1477
alg/agr 10x10 ⁶	0,4720	167,85	1,9479E-03	5,6213	28,679	0,1906

Priloga C: Rezultati statistične analize podatkov, o izražanju izbranih genov – Friedmanov in Wilcoxonov test (n=5, p< 0,05; statistično signifikantni rezultati so pobarvani rdeče)

Kolagen II

Friedmanov test(a)

N	5
λ^2	10,680
df	3
Asimp. Sig.	,014

Wilcoxonov test(c)

	Alg/agr 5x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 5x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 1x10 ⁶ - p2 mono	Alg/agr 5x10 ⁶ - p2 mono	Alg/agr10x10 ⁶ - p2 mono
Z	-,944(a)	-,674(a)	-1,753(a)	-2,023(b)	-2,023(b)	-2,023(b)
Asimp. Sig. (2-stransko)	,345	,500	,080	,043	,043	,043

a Na osnovi pozitivnih vrednosti.

b Na osnovi negativnih vrednosti.

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga C**: Rezultati statistične analize podatkov, o izražanju izbranih genov – Friedmanov in Wilcoxonov test (n=5, p< 0,05; statistično signifikantni rezultati so pobarvani rdeče)

Agrekan

Friedmanov test(a)

N	5
λ^2	11,640
df	3
Asimp. Sig.	,009

Wilcoxonov test(c)

	Alg/agr 5x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 5x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 1x10 ⁶ - p2_mono	Alg/agr 5x10 ⁶ - p2_mono	Alg/agr10x10 ⁶ - p2_mono
Z	-1,214(a)	-1,483(a)	-2,023(a)	-2,023(b)	-2,023(b)	-1,753(b)
Asimp. Sig. (2-stransko)	,225	,138	,043	,043	,043	,080

a Na osnovi pozitivnih vrednosti.

b Na osnovi negativnih vrednosti

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga C**: Rezultati statistične analize podatkov, o izražanju izbranih genov – Friedmanov in Wilcoxonov test (n=5, p< 0,05; statistično signifikantni rezultati so pobarvani rdeče)

Kolagen I

Friedmanov test(a)

N	5
λ^2	10,680
df	3
Asimp. Sig.	,014

Wilcoxonov test(c)

	Alg/agr 5x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 5x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 1x10 ⁶ - p2 mono	Alg/agr 5x10 ⁶ - p2 mono	Alg/agr10x10 ⁶ - p2 mono
Z	-2,023(a)	-1,483(a)	-2,023(a)	-1,214(b)	-,135(a)	-2,023(a)
Asimp. Sig. (2-stransko)	,043	,138	,043	,225	,893	,043

a Na osnovi pozitivnih vrednosti.

b Na osnovi negativnih vrednosti

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga C**: Rezultati statistične analize podatkov, o izražanju izbranih genov – Friedmanov in Wilcoxonov test (n=5, p< 0,05; statistično signifikantni rezultati so pobarvani rdeče)

Verzikan

Friedmanov test(a)

N	5
λ^2	9,960
df	3
Asimp. Sig.	,019

Wilcoxonov test(c)

	Alg/agr 5×10^6 – alg/agr 1×10^6	Alg/agr 10×10^6 – alg/agr 5×10^6	Alg/agr 10×10^6 – alg/agr 1×10^6	Alg/agr 1×10^6 - p2 mono	Alg/agr 5×10^6 - p2 mono	Alg/agr 10×10^6 - p2 mono
Z	-1,753(a)	-2,023(a)	-2,023(a)	-1,214(b)	-1,214(b)	-2,023(a)
Asimp. Sig. (2-stransko)	,080	,043	,043	,225	,225	,043

a Na osnovi pozitivnih vrednosti.

b Na osnovi negativnih vrednosti

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga C**: Rezultati statistične analize podatkov, o izražanju izbranih genov – Friedmanov in Wilcoxonov test (n=5, p< 0,05; statistično signifikantni rezultati so pobarvani rdeče)

Kolagen II/ Kolagen I

Friedmanov test(a)

N	5
λ^2	9,720
df	3
Asimp. Sig.	,021

Wilcoxonov test(c)

	Alg/agr 5x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 5x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 1x10 ⁶ - p2 mono	Alg/agr 5x10 ⁶ - p2 mono	Alg/agr10x10 ⁶ - p2 mono
Z	-,135(a)	-1,483(b)	-,135(b)	-2,023(b)	-2,023(b)	-2,023(b)
Asimp. Sig. (2-stransko)	,893	,138	,893	,043	,043	,043

a Na osnovi pozitivnih vrednosti.

b Na osnovi negativnih vrednosti

(se nadaljuje)

nadaljevanje: **Priloga C**: Rezultati statistične analize podatkov, o izražanju izbranih genov – Friedmanov in Wilcoxonov test (n=5, p< 0,05; statistično signifikantni rezultati so pobarvani rdeče)

Agrekan/ Verzikan

Friedmanov test(a)

N	5
χ^2	9,960
df	3
Asimp. Sig.	,019

Wilcoxonov test(c)

	Alg/agr 5x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 5x10 ⁶	Alg/agr 10x10 ⁶ – alg/agr 1x10 ⁶	Alg/agr 1x10 ⁶ - p2 mono	Alg/agr 5x10 ⁶ - p2 mono	Alg/agr10x10 ⁶ - p2 mono
Z	-,674(a)	-1,483(b)	-,135(b)	-2,023(b)	-2,023(b)	-2,023(b)
Asimp. Sig. (2-stransko)	,500	,138	,893	,043	,043	,043

a Na osnovi pozitivnih vrednosti.

b Na osnovi negativnih vrednosti

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Daliborka DUŠANIĆ

**SPREMLJANJE FENOTIPSKIH LASTNOSTI
ČLOVEŠKIH HRUSTANČNIH CELIC MED
GOJENJEM V ALGINAT/AGAROZNEM GELU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

Popravki: