

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

UPORABA MATIČNIH CELIC V GENSKIH TERAPIJAH

Raziskovalno področje Biologija

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: IVA KLARA HLIS

Mentor: IRIS VINKO

Šola: SREDNJA ELEKTRO-RAČUNALNIŠKA ŠOLA MARIBOR

Število točk: 134

Mesto: 7

Priznanje: bronasto

Maribor, 2019

»Mladi za napredek Maribora 2019«
36. srečanje

UPORABA MATIČNIH CELIC V GENSKIH TERAPIJAH

Raziskovalno področje Biologija

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Maribor, 2019

KAZALO

UPORABA MATIČNIH CELIC V GENSKIH TERAPIJAH.....	1
UPORABA MATIČNIH CELIC V GENSKIH TERAPIJAH.....	2
KAZALO.....	3
POVZETEK.....	4
ZAHVALA.....	5
1. UVOD.....	6
2. METODOLOGIJA DELA.....	7
2.1 PREGLED LITERATURE.....	8
2.2 IZOLACIJA CELIC IZ LIPOASPIRATA.....	12
3. REZULTATI.....	15
4. RAZPRAVA.....	18
5. ZAKLJUČEK.....	22
6. SEZNAM VIROV IN LITERATURE.....	23
7. DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	24

KAZALO SLIK

Slika 1: Matične celice v telesu (Vir 1).....	8
Slika 2: Milteny naprava (Vir 5).....	10
Slika 3: Lipoaspirat po posegu.....	13
Slika 4: Celice povečava 10x.....	13
Slika 5: Spiranje celic.....	13
Slika 6: Encimska razgradnja.....	13
Slika 7: Mesh filter.....	14
Slika 8: Celice 10x povečava.....	14
Slika 9: Celice 10x 2.dan.....	14
Slika 10: Celice dan 2.....	14
Slika 11: Celice dan 3.....	14
Slika 12: Aplikacija celic v koleno (Vir 2).....	15
Slika 13: Interval zaupanja.....	16
Slika 14: Viabilnost celic.....	16
Slika 15: Injekcijska igla.....	17

KAZALO TABEL

Tabela 1: Potek ločevanja celic (Vir 5).....	9
Tabela 2: Prednosti uporabe matičnih celic (Vir 6).....	10
Tabela 3: Postopek aplikacije celic v pacienta (Vir 3).....	12
Tabela 4: Primerjave celic po dnevih.....	15
Tabela 5: Seznam bolezni, ki jih lahko zdravimo s matičnimi celicami (Vir 3).....	21

POVZETEK

Matične celice so samo ena izmed številnih vej regenerativne medicine. Predstavljeni so različni načini pridobivanja matičnih celic iz tkiv in organov ter njihova uporaba. Ker je človeško telo sestavljeno iz več milijard celic, je edini logičen sklep da je najbolje različne bolezni zdraviti na celičnem nivoju saj je tako zdravljenje najbolj učinkovito in ne povzroča veliko stranskih učinkov. Hkrati se pri takšnem načinu zdravljenja pojavijo številne etične dileme, ki jih je potrebno še dodatno nasloviti. Področje uporabe matičnih celic se izjemno hitro razširja in bo v nekaj letih zagotovo sprožilo izjemno revolucijo v industriji, nekateri jo primerjajo kar z odkritjem penicilina in njegove množične uporabe brez katerega danes tudi ne bi bilo številnih antibiotikov.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici za vso podporo pri izdelavi raziskovalne naloge, ter svoji mami, ki me je tekom izdelave te naloge vedno podpirala.

1. UVOD

Cilj predlagane raziskave je predstaviti celovit pojem matičnih celic, njihove edinstvene lastnosti, uporabo pri zdravljenju različnih poškodb in bolezni, prav tako pa tudi opisati primere dobre prakse. Področje regenerativne medicine je eno izmed najhitreje se razvijajočih. Potrebno je tudi ločiti vire pridobivanja matičnih celic. V klasičnem pomenu pridobivanja matičnih celic poteka celoten postopek iz lastnega pacientovega tkiva ali krvi. Uporaba embrionalnih oz. t.i. zarodnih matičnih celic je v Evropski uniji prepovedana zaradi številnih etičnih zadržkov saj pri taksnem delu ubijemo zarodek. Embrionalne matične celice imajo lastnost totipotentnosti to pomeni da se lahko diferencirajo v katerokoli celico v človeškem telesu. Te celice so aktivne samo ob nastanku novega organizma torej pri spočetju. Z napredkom tehnologije in dodatnimi raziskavami na področju matičnih celic so znanstveniki odkrili številne druge matične celice ki imajo lastnosti pluripotentnosti, to pomeni da se lahko diferencirajo v več različnih celic, ne pa v katerokoli. Ker je področje uporabe matičnih celic zelo široko ga je potrebno ustrezno razdeliti. Sicer je najbolje razdeliti uporabnost matičnih celic glede na namen in sicer:

- shranjevanje matičnih celic ob rojstvu (izolacija iz popkovnične krvi), komercialne bio-banke
- izolacija matičnih celic iz kostnega mozga, katere se predhodno spodbudijo z imobilizacijskimi agenti, da se le ti izločijo v kri. Njihova presaditev se uporablja pri različnih oblikah raka (standardna oblika zdravljenja na zavodu za transfuzijsko medicino
- izolacija in uporaba matičnih celic pri zdravljenju poškodb in sicer mehkih in trdnih tkiv (izolacija iz adipocitnega tkiva)
- uporaba matičnih celic v plastični kirurgiji, ki se jih pridobiva iz lipoaspirata (zdravljenje brazgotin in gub)
- izolacija matičnih celic iz periferne krvi (zdravljenje različnih vrst bolezni Zavod za transfuzijsko medicino)
- izolacija in uporaba matičnih celic za raziskave in druge produkte

Tudi v Sloveniji imamo bogato tradicijo raziskav in dela na področju z matičnimi celicami, tako v Sloveniji delujejo številne bio-banke v katerih je mogoče shraniti matične celice ki smo jih predhodno izolirali iz popkovnične krvi, prav tako se veliko dela na področju zdravljenja raka, razvoj tukaj vodi zavod za transfuzijsko medicino. Prav tako je v Sloveniji tudi nekaj zasebnih klinik in ortopedov ki uporabljajo matične celice pri zdravljenju različnih poškodb. Slovenija je tudi kot država prepozna izjemen potencial matičnih celic, zato je tudi v dokumentu pametne specializacije S4 omenjeno prednostno področje razvoja regenerativne medicine. Trenutno je še vedno največja omejitev širše uporaba matičnih celic v medicini cena njihovega pridobivanja. Ena terapija, odvzema celic, izolaciji, karakterizacije in gojenja ter aplikacije v pacienta, hitro preseže več 10. 000 EUR. Tukaj je še potrebno poudariti relativno slabo poznavanje področja s strani splošne in strokovne javnosti, ter potrebo po dodatnem opravljanju različnih raziskav ter dokazovanju delovanja matičnih celic in primerov dobre prakse. Seveda je kot pri vsakem operativne postopku možnost kakšne napake. Znanstveniki poizkušajo različne pristope k zdravljenju raka, eden izmed teh je tudi onemogočiti mehanizem diferenciacija, oz. z drugimi besedami onemogočiti celici delitev. To v praksi pomeni da se celica nebi mogla več deliti naprej kar bi tudi preprečilo razvoj raka, za že obstoječi tumor se pa lahko uporabijo različni minimalno invazivni posegi za odstranitev oz. klasično zdravljenje s citostaltiki. Prihodnost medicine je v t.i. personalizirani medicini in uporaba lastnih matičnih celic pri zdravljenju je definitivno prvi korak k končnem cilju.

2. METODOLOGIJA DELA

Pri raziskovalni nalogi bomo uporabili pregled literature oz. (t.i state of the art), eksperimentalno delo ter metodo primerjave. Pred začetkom dela pa si bomo postavili naslednje hipoteze.

1. Hipoteza: v človeškem telesu se nahaja več primernih virov matičnih celic.
2. Hipoteza: adipocitno tkivo je eden izmed najprimernejših virov matičnih celicam.
3. Hipoteza: matične celice so primerne za zdravljenje različnih bolezni in poškodb.

Kot pregled literature, bo predstavljen opis pridobivanja celic, definicija matične celice, primerno tkivo v človeškem telesu ki vsebuje večjo količino celic, primer pridobivanja krvotvornih matičnih celic na zavodu za transfuzijsko medicino. Eksperimentalni del bo obsegal primer pridobivanja lipoaspirata, izolacijo celic iz lipoaspirata, slike teh celic. Metoda primerjave bo vključevala pozitivne in negativne lastnosti terapije z matičnimi celicami in klasično metodo zdravljenja, ter primerjave različnih vzorce izolacije matičnih celicami.

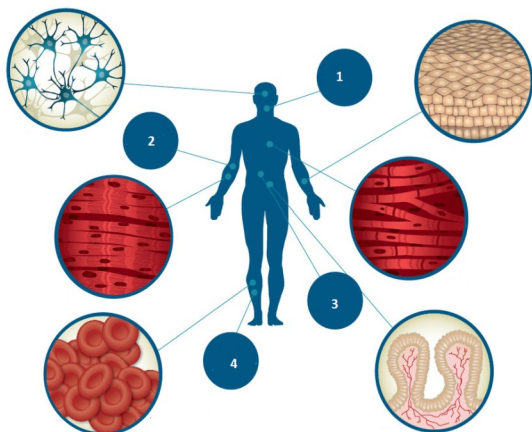
Tekom raziskovalne naloge bo predstavljeni tudi dodatni načini pridobivanja matičnih celic, naprave za njihovo pridobivanje, protokoli izolacije, naprave uporabljene pri izolaciji. Prav tako bo v raziskovalni nalogi predstavljen seznam nekaterih bolezni, za katere že danes vemo da jih je mogoče zdraviti s pomočjo matičnih celic. Seveda je seznam možnih zdravljenih bolezni še veliko daljši, zato bomo tukaj izpostavili samo nekaj bolezni. Praktične aplikacije celic na človeškem telesu žal tekom raziskovalne naloge ne bomo morali preizkusiti saj bi za to potrebovali dovoljenje komisije za medinsko etiko, dovoljenje UKC Maribor ali podobne institucije ter ustrezno ekipo strokovnjakov za delo s celičnimi kulturami.

Zaradi zagotavljanja sterilnih pogojev ter ustreznega dela v laboratoriju in s ustrezno opremo bomo praktični del naloge izvajali na Medicinski Fakulteti v Mariboru. Tekom dela bomo upoštevali dobre laboratorijske prakse, delovali v skladu z navodili varnega dela, upoštevali vse zakone in predpise od delu z tkivi. Ker delamo z biološkimi vzorci bomo uporabljali ustrezno osebno zaščitno ter varovalno opremo kot so laboratorijski plašč, zaščitne rokavice, maska, očala. Delo z biološkimi vzorci bomo upravljali v digestoriju z nadtlanim prezračevanjem. Po končanem delu bomo delavno površino ustrezno očistili in razkužili da preprečimo morebitno kontaminacijo ali razvoj različnih mikroorganizmov. V skladu s pravili za varno delo v laboratoriju bomo vzorce tkiva ki ga ne bomo več potrebovali ustrezno uničili.

Za zagotavljanje doseganja ciljev raziskovalne naloge bo v le te tudi vključeno poglavje družbene odgovornosti. V tem poglavju bo tudi opisano zakaj ta naloga prispeva k družbeni odgovornosti, to je pozitivni vpliv predvsem na zdravje ljudi in živali. Poudarek bo tudi na ostali možnih pozitivnih družbenih učinkih kot je razvoj novih znanj in spoznanj, prost dostop do znanstvenih publikacij, ustvarjanje novih delavnih mest v visoko dodano vrednostjo.

Tekom raziskovalne naloge ne bomo delali poskusov oz. pridobivali embrionalnih matičnih celic saj to ni v skladu z zdravniško etiko ter slovensko in evropsko zakonodajo. Embrionalne matične celice bomo samo teoretično omenili v razpravi, saj je mogoče najti številne pozitivne učinke takšnih celic vendar je moralno sporen predvsem del pridobivanja teh celic.

2.1 PREGLED LITERATURE



Slika 1: Matične celice v telesu (Vir 1)

Najpogostejše lokacije v katerih se nahajajo matične celice v tkivu so: adipocitno tkivo, periferna kri, kostni mozeg, jetra, možgansko tkivo, zobna pulpa, gladka mišična tkiva, popkovnična kri, popkovnica, različni tipi zarodkov. Razlika med posameznimi lokacijami celic je predvsem v količini celic, ki se tam nahajajo in po načinu njihovega pridobivanja. Tako je na primer veliko enostavneje pridobivati celice iz adipocitnega tkiva kot pa in kostnega mozga ali periferne krvi, saj je tam veliko večja možnost neželenih učinkov za pacienta, prav tako je ponavadi adipocitnega tkiva v telesu veliko več kot ga le to potrebuje za normalno delovanje.

Kot je prikazano na sliki 1 je v človeškem telesu več možnih virov matičnih celic. Težava se pojavi ko želimo te celice izolirati oz. pridobiti. Prav tako je vprašanje kako lahko sploh dokažemo da je naša celica res matična. Matičnost po definiciji pomeni sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije. Matičnost pa dokazujemo z t.i. označevalci. Vsaka celica ima na svoji površini specifične anti gene. Znanstveniki se nekako strinjajo da so potrebni vsaj 4 specifični antigeni na površini celice da lahko trdimo da imamo matično celico. Seveda je takšen postopek pridobivanja drag, zato se velikokrat uporablja zelo enostavne proces t.i. koncentracije. To pomeni da zdravnik odvzame določen vzorec tkiva, to tkivo potuje v laboratorij, kjer se ga ustrezno obdela, največkrat je to z določenimi mehanskimi postopki centrifuge. Ker je tkivo sestavljeno iz več različnih celic se le tukaj tvorijo določene plasti. V vsaki izmed teh plasti imamo določene celice in laboratorijski tehnik odvzame določeno frakcijo teh celic ter jih vstavi v injekcijsko iglo, ki jo pošlje nazaj v ambulanto, kjer jo zdravnik aplicira nazaj v pacienta. Takšen postopek je relativno cenovno lahko dostopen vendar ima nekaj ključnih pomanjkljivosti: ne moremo z zagotovo trditi katere celice smo aplicirali v pacienta, možnost kontaminacije je velike, lahko pride do zavrnitve, pojavijo se lahko številne zdravstvene težave, postopek ni učinkovit, oz. ne dosežemo želenega učinka zdravljenja.

Zaradi zgoraj naštetih lastnosti so se s časom razvile določene avtomatizirane rešitve ki temeljijo avtomatiki in nano tehnologiji ter so primerne za množično proizvodnjo. Seveda ti sistemi zahtevajo laboratorijsko okolje in ustrezno usposobljen kader vendar nam omogočajo boljši in bolj množični način proizvodnje matičnih celic. Eden izmed takšnih sistemov je t.i. magnetna nano separacija celic. Na nano delce kovine, največkrat železove nano delce je vezano specifično protitelo ki ga izražajo matične celice. Le to protitelo deluje s celico kot ključ in ključavnica. Medsebojno se privlačita in povežeta. Nato se ta specifična celica suspenzija prenese v magnetno polje, magnet privlači nano delce z vezanimi matičnimi celicami, vse ostale celice pa ne ostanejo v magnetnem polju in se jih zbira ločeno v zbiralniku. V naslednjem koraku je potrebno ločiti nano magnetne od celic saj le teh ne moremo aplicirati direktno v človeško telo. Ne nano magnetne se največkrat loči z mešanico specifičnih pulferjev ali z drugimi že v naprej pripravljenimi raztopinami.

	<p>Centrifugiranje poteka tako, da odvzeti vzorec vstavimo v centrifugo. Velikost in tip naprave sta odvisna od količine vzorca. Pri centrifugi je potrebno vedno biti pazljiv da je le ta na ravni podlagi in enakomerno obtežena, saj lahko pride do uničenja naprave v nasprotnem primeru. Celice se centrifugirajo pri sili nekaj 100G.</p>
	<p>Ločevanje celic na napravi poteka tako da že mehansko obdelane celice vstavimo v napravo, kjer se jim avtomatsko dodajajo protitelesa z nano delci, kasneje gre ta zmes v kolono, kjer se tvori magnetno polje. Tarčne celice ostanejo v magnetnem polju, vse ne tarčne gredo naprej v odpad. Zadnji korak je encimska obdelava in priprava celic.</p>
	<p>Testiranje celic z označevalci je namenjeno potrditvi da smo res izolirali naše tarčne celice. Po definiciji more matična celica vsebovati vsaj 4 označevalce da lahko z veliko verjetnostjo trdimo da imamo matično celico. Označevalci se seveda tudi razlikujejo glede na ostale pod populacije celic.</p>
	<p>Gojenje celic in vitro poteka v laboratoriju, namen je pa pridobiti dovolj veliko količino celic, saj je pri posegu količina le teh majhna in ni primerna za vsako operacijo. Pri gojenju je potrebno večkrat izvajati teste kakovosti zaradi možnosti kontaminacije.</p>
	<p>Priprava za shranjevanje ali aplikacijo je odvisna od samega namena. Pri odvzemu in izolaciji celic iz popkovnične krvi gredo le to ponavadi na zmrzovanje in shranjevanje za kasnejšo uporabo. Celice se postopoma zamrzne na - 80 stopinj celzija in se jih lahko v takem stanju hrani do 20 let.</p>
	<p>Apliciranje celic direktno v pacienta se zelo pogosto uporablja v praksi za zdravljenje različnih poškodb mehkih tkiv ali za zdravljenje po opravljenih kemo terapijah in ostalih posegih.</p>

Tabela 1: Potek ločevanja celic (Vir 5)

Potrebno je poudariti da je po separaciji mogoče te celice vstaviti direktno v človeško telo, čeprav se v praksi še naredi dodatna kontrola in ali in vitro gojenje celic v kulturi saj je potrebno veliko število celic da lahko dosežemo določen učinek. Navadno si želimo imeti več milijonov celic v nekaj mililitrih raztopine. Takšen način magnetne bio separacije se največkrat uporablja na tekočih tkivih kot so kri in kostni mozeg. Na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani že več let uporabljajo takšen sistem ter na leto pomagajo več tisoč pacientom. Težava tega sistema je visoka cena in tudi omejitev na samo 8 specifičnih tipov celic. Drži da gre za osem pogosto uporabljenih tipov celic v določenih imuno terapijah vendar le te niso primerne za zdravljenje vseh bolezni. Prav tako je odvzem kostnega mozga izjemno boleč iz zahteven operativni postopek. Pacient more biti v lokalni anesteziji in kirurg mora zvrtniti s svedrom v medenico da lahko odvzame med 50 in 250 ml kostnega mozga ki gre v procesiranje. Tekom samega operativnega postopka so možni številni zapleti, prav tako je velika možnost okužbe. Za bolnika z oslabljenim imunskim sistemom pa je lahko vsaka okužba tudi smrtno nevarna. Zato se kot alternativni postopek uporablja izolacija matičnih celic iz periferne krvi, pri kateri uporabimo imobilizacijske agente za boljši izkoristek. Res je da je v periferni krvi koncentracija matičnih celic veliko nižja kot v kostnem mozgu, vendar je odvzem krvi dokaj enostaven in minimalno boleč postopek ki ga je mogoče tudi večkrat ponoviti. Ker se postopek ponavlja je tudi mogoče zavreči katero serijo v primeru suma na kontaminacijo ali drugo neustreznost.



Eden izmed sistemov, ki se ga v Sloveniji uporablja je naprava Milteny BioTech Pure. Gre za primer magnetne separacije, pri katerem se na naše tarčne celice vežejo nano magneti z prej določenimi protitelesi. Celotna mešanica celic in magnetov gre nato čez magnetno polje v katerem se zadržijo naše tarčne celice, vse ostale ne tarčne celice pa gredo med odpad. Nato izklopimo magnetno polje in izberemo samo naše tarčne celice, ki pa jim je potrebno še predhodno odstraniti magnetne nano delce z protitelesi. To naredimo s postopkom encimske razgradnje.

Slika 2: Milteny naprava (Vir 5)

Seveda tudi postopki presaditve matičnih celic iz periferne krvi pridejo z določenimi tveganji. Pacienti poročajo o nekaterih stranskih učinkih ki so opisani v spodnji tabeli:

Prednosti	Slabosti
Višje število celic cd 34+	Uporaba mobilizacijskih agentov
Nižji stroški naprav pridobivanju iz kostnega mozga	Tveganje kronične bolezni presadka
Manj bolečin in možnosti okužbe	Venski dostop je lahko problem
Hitrejša regeneracija trombocitov	Vprašljivo preživetje
Hospitalizacija ni potrebna	Stranski učinki

Tabela 2: Prednosti uporabe matičnih celic (Vir 6)

Največji problem je seveda uporaba mobilizacijskih agentov. Tukaj gre za posebna zdravila, ki delujejo na krvožilni obtok in okoliške organe ter prispevajo v mobilizaciji dodatnih matičnih celic, saj jih v sami krvi ni dovolj za določena zdravljenja. Delno se je temu mogoče izogniti z gojenjem v in vitro kulturah. Vsekakor je smiselno kot prvi korak izolirati celice iz krvi in se po morebitni neuspešnosti terapije preusmeriti na kostni mozeg saj prihranimo veliko finančnih sredstev ter bolečine pacientu. V Sloveniji se danes presaditev matičnih celic iz krvi in kostnega mozga uporablja kot standardni pristop k zdravljenju različnih bolezenskih stanj.

2.2 IZOLACIJA CELIC IZ LIPOASPIRATA

Kot eksperimentalni del bo v nalogi predstavljen primer odvzema adipocitnega tkiva in lipoaspirata pacienta, ki bo kasneje uporabljen za izolacijo matičnih celic ter njihovo in vitro gojenje na ustreznih celičnih gojiščih. Odvzem in aplikacija lipoaspirata poteka po naslednjih korakih, ki so prikazani v tabeli 3.


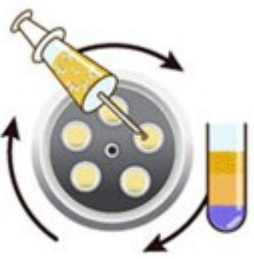


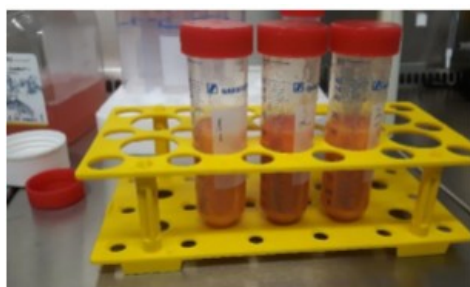
	<p>Odvzem tkiva iz pacienta poteka predvsem iz trebušnega dela, saj je tam največ adipocitnega tkiva. Med posegom se običajno odvzame 50 ml tkiva, na pacientovo željo se ga lahko seveda tudi več. Pri določenih operacijah se odvzame tudi po več litrov adipocitnega tkiva.</p>
	<p>Centrifugiranje poteka tako da vialo s adipocitnim tkivo najprej ročno očistimo večjih delcev in nečistoč, ter nato centrifugiramo 20 minut pri 3000 obratih na minuto. Na tak način mehansko ločimo celice na več frakcij. Ustvarijo se nam trije sloji in sicer na dnu eritrocite, na sredini lahka frakcija in na zgornjem delu olje. Za kasnejše gojenje potrebujemo lahko frakcijo.</p>
	<p>In vitro gojenje celic je potrebno zaradi majhne količine celic ki jih dobimo na tak način in tudi njihovega kasnejšega čiščenja. Potrebno je opozoriti da lahko gojimo največ 4 pasaže, in sicer zaradi tega ker se po 4 pasažah začnejo pojavljati spremembe pri celicah, oz. pride do samo diferenciacije.</p>
	<p>Aplikacija v pacienta lahko poteka na različne načine. Lahko direktno na mesto poškodbe ali pa preko venskega kanala v krvni sistem. Aplikacija je seveda neboleča in za pacienta predstavlja minimalno tveganje saj gre za njegovo lastno tkivo ki ga telo ne more zavrniti.</p>

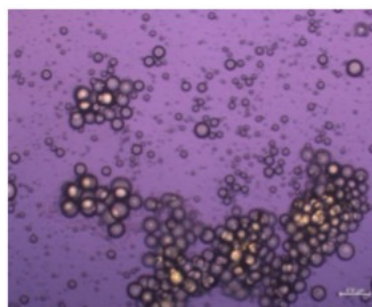
Tabela 3: Postopek aplikacije celic v pacienta (Vir 3)

Adipocite so del maščobnega tkiva. Tkivo, ki ga ima vsak človek je mogoče z minimalno invazivnim posegom odstraniti ter je praktično na voljo v neomejenih količinah. Lahko se uporablja ali klasičen lipoaspirat ali pa del maščobnega tkiva v kosu. Zdravnik z injekcijsko iglo volumna okrog 50 ml odstrani takšno količino tkiva, za anestetik se pa uporablja adrenalin. To tkivo gre potem na razgradnjo s kolagenazo oz. različni encimi. Nato se uporablja klasično centrifugalno razbijanje tkiva, spiranje ter na koncu koncentriranje in ponovna uporaba tkiva pri aplikaciji v pacienta ali nadaljnjem gojenju v in vitro kulturi.

Odvzem tkiva je potekal v sodelovanju z Medicinsko Fakulteto v Mariboru. Dobili smo 3 vial z 50ml lipoaspirata kot odpadnega materiala pri operaciji. Te lipoaspirate smo uporabili za nadaljevanje raziskave.

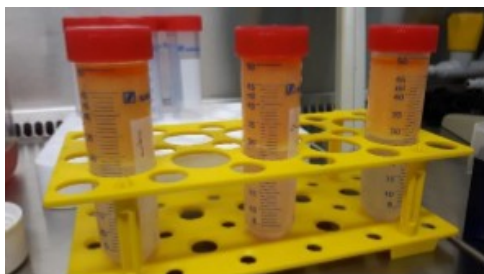


Slika 3: Lipoaspirat po posegu



Slika 4: Celice povečava 10x

Lipoaspirat smo položili pod mikroskop in nastavili 10x povečavo. Na sliki vidimo veliko adipocit, kar je posledica narave samega vhodnega materiala torej maščobe. To maščobo je potrebno dodatno razgraditi in obdelati na različne načine. Testirali smo mehansko in encimsko razgradnjo.



Slika 5: Spiranie celic



Slika 6: Encimska razgradnja

Postopek obdelave je obsegal spiranje vzorca in encimsko razgradnjo ter gradientno centrifugiranje. Po približno 3 spiranjih ter 20 minutnem centrifugiranju dobimo gladko zmes celic ter fino suspenzijo, ki jo naknadno še prefiltriramo skozi 70 mikro metrski mesh filter.



*Slika 7:
Mesh filter*

Filtriranje skozi 70 mikro meterski filter je namenjeno odstranjevanju trdih delcev, delcev kapilar ter ostalih nečistoč. Ta filter pa ne odstrani eritrocitov, ki so lahko problematični saj jih je zelo težko odstraniti. Za odstranjevanje le teh moremo uporabiti posebno pripravljeno kemikalijo.

Po končanju zgoraj opisanega postopka smo zbrane celice zbrali v viali in odvzeli vzorec za mikroskopiranje. Uporabili smo 10x povečavo.

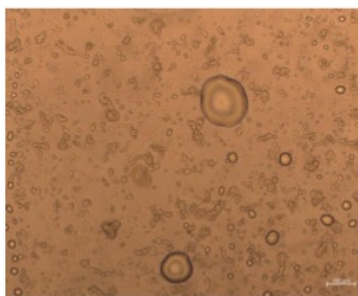


Slika 8: Celice 10x povečava



Slika 9: Celice 10x 2.dan

Ko primerjamo lipoaspirat pred in po obdelavi lahko vidimo da se je število adipocit praktično znižalo na nič, odstranili smo tudi velik del eritrocitov. Vendar takšna celična suspenzija še ni primerna za direktno aplikacijo ampak jo je potrebno nanesti na ustrezno gojišče za rast celic.



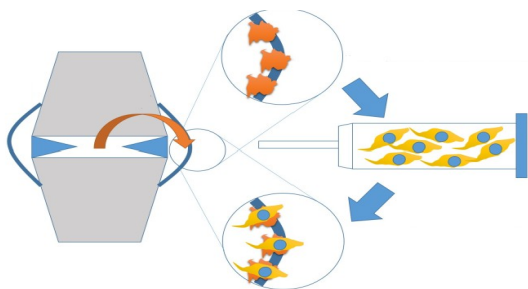
Slika 10: Celice dan 2



Slika 11: Celice dan 3

Po enem dnevu smo pogledali celično suspenzijo pod mikroskopom. Ugotovili smo da je še vidna prisotnost adipocit, vendar je občutno manjša kot v začetnem vzorcu. Nato smo celice vsak naslednji dan tudi presadili in na zadnji sliki vidimo končen produkt. Celična kultura, v kateri je povečano število matičnih celic, prav tako je ostalo še nekaj eritrocitov, ki pa ne predstavljajo bistvene težave.

Končnega dela aplikacije matičnih celic v pacienta ni bilo mogoče izvesti saj nam to prepoveduje zakonodaja, zato smo samo teoretično nakazali kako bi potekalo zdravljenje. Celično suspenzijo bi odstranili iz kulture in aplicirali v injekcijsko iglo s pomočjo katere bi nato zdravnik apliciral celice direktno v pacientovo koleno.



Slika 12: Aplikacija celic v koleno (Vir 2)

Kadar apliciramo celice direktno na mesto poškodbe jim ponavadi predhodno dodamo določene rastne faktorje da jih že malenkost usmerimo v katere celice se naj diferencirajo. Tukaj gre ponavadi za hrustanec ali različna ostala mehka tkiva v kolenu. Takšen način posega je veliko manj boleč in hitrejši kot klasična operacija.

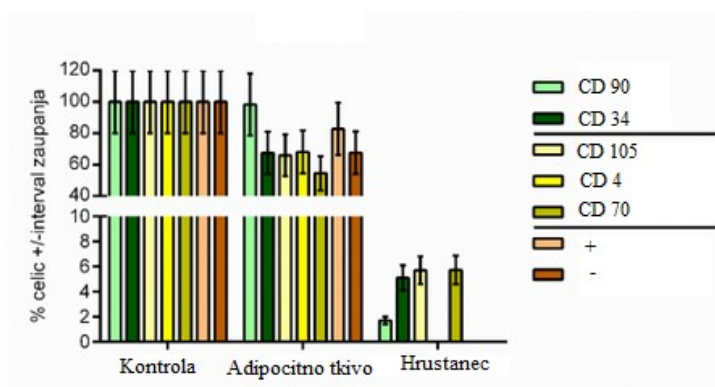
3. REZULTATI

Vzorke zbrane z odvzemom lipoaspirata smo slikali pod mikroskopom med različnimi fazami postopka pridobivanja matičnih celic. Glede na sekvenco dela, lahko postavimo naslednje sklepe:

	<p>Začetni lipoaspirat je nespecifičen, imamo različno število različnih celic, matičnih celic med njimi ni mogoče prepoznati, težavo predstavlja veliko število eritrocitov, zmes ni tekoča, potrebna je mehanska in kemična obdelava. Na sliki so razvidne samo adipocite ki predstavljajo tudi večino celic v tem vzorcu.</p>
	<p>Po razgradnji in centrifugiranju ter gojenju na gojišču se začnejo izražati matične celice. Adipocit je občutno manj, predstavljajo zgolj 10% celotne celične suspenzije. Suspenzija je tekoča, specifičnost se izraža, odstranjeni so adipociti. V tej fazi je potrebno tudi zamenjati celični medij ter narediti novo pasažo oz. presaditev celic v novo gojišče</p>
	<p>Po treh dneh lahko vidimo matične celice že s prostim očesom glede na obliko, adipocit smo se v celoti znebili, eritrocitov je bistveno manj. Takšna suspenzija je primerna za aplikacijo v pacienta. Seveda če želimo trditi da imamo matične celice je potrebno še prej preveriti njihovo gensko ekspresijo.</p>

Tabela 4: Primerjave celic po dnevih

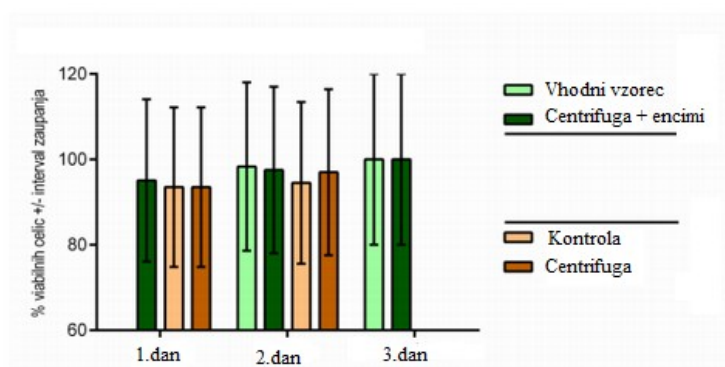
Ker smo želeli tudi potrditi, da so naše celice res matične smo naredili primerjalni test med kontrolno skupino, ki ima potrjeno matičnost, hrustancem ki kot tak ne vsebuje matičnih celic in našim pridobljenimi celicami. Glede na ugotovljen interval zaupanja lahko trdimo, da gre v našem primeru res za matične celice kar lahko prikažemo tudi grafično.



Podatki ekspresije posameznih celičnih označevalcev, ki so značilni za matične celice so predstavljeni na intervalu zaupanja, ki nam omogoča da z nekim procentom lahko trdimo ali imamo pravilne celice ali ne, v našem primeru lahko z 80% trdimo da imamo pravilne celice, to so matične celice.

Slika 13: Interval zaupanja

Izvedli smo še dodatne teste štetja celic. Celice smo prešteli v vhodnem vzorcu in pa pri dveh vzorcih ki smo jih še dodatno mehansko in kemično obdelali. Pri vhodnem materialu se je pojavila težava ker je bila sama suspenzija preveč gosta in naprava ni bila sposobna zaznati celic zato v prvem dnevu nimamo oštevilčenega prvega vzorca. Drugi dan smo uvedli kontrolni test da smo preverili natančnost naprave. Ugotovili smo da je naprava natančna saj je imela več kot 90% interval zaupanja. Tretji dan smo prešteli samo vhodni vzorec in pa naš testni vzorec saj nas je zanimalo samo število celic pred in po obogatitvi. Ugotovili smo, da je število celic enako, ampak se je spremenila njihova sestava v samem vzorcu. To pomeni da imamo namesto adipocit, trombocitov, eritrocitov, ipd. sedaj v vzorcu povečano število matičnih celic in izjemno majhno število adipocit ter eritrocitov s čimer lahko potrdimo da smo uspešno izolirali matične celice iz danega vzorca lipoaspirata.



Z napravo za štetje celic MUSE smo prešteli celice po dnevih. Število celic se po posameznih dnevih bistveno ne spremeni se pa spremeni njihova sestava. Bolj ko se približujemo zadnjemu dnevu bolj lahko vidimo izražanje matičnih celic in manj izražanja adipocit ter eritrocitov.

Slika 14: Viabilnost celic

Tekom celotnega postopka dela smo bili izjemno pazljivi na morebitne kontaminacije. Upoštevali smo tudi vsa navodila za varno delo v laboratoriju. Ugotovili smo tudi da po 3 ali 4 opravljenih presaditvah celic v in vitro kulturi se le te začnejo diferencirati, oz. se lahko v določenih primerih pokažejo tudi možnosti kontaminacije. Po opravljenih eksperimentih smo vse celične kulture varno

uničili. Dodatni smo preizkušali ali bi bilo mogoče razgraditi maščobni material na mehanski način vendar smo ugotovili da to zaradi velike gostote same maščobe ni mogoče.



Odvzem z injekcijsko iglo je zelo problematičen zaradi same gostote materiala. Tekom eksperimenta smo zamenjali 3 različne igle saj v določenem trenutku ni bilo več iz njih mogoče odstraniti ničesar. Iz tega lahko sklepamo da je optimalen način encimska razgradnja v kombinaciji z izpiranjem in centrifugiranjem. Testirali smo tudi direktno aplikacijo encimov v injekcijsko iglo ki je zmehčala sam lipoaspirat ampak v primerjavi z centrifugiranjem so bili rezultati bistveno slabši zato se tak način dela mehanske razgradnje ne priporoča.

*Slika 15:
Injekcijska igla*

Poudariti je treba da obstaja še več različnih protokolov za izolacijo matičnih celic iz adipocitnega tkiva, vendar jih zaradi finančnih in časovnih omejitev nismo testirali. Zanimivo bi bilo testirati tudi magnetno bio separacijo, vendar je edina naprava dostopna na Zavodu za transfuzijsko medicino v Ljubljani in ne podpira dela z adipocitnim tkivom ampak samo s periferno krvjo in kostnim mozgom.

4. RAZPRAVA

Tekom raziskave smo ugotovili da je adipocitno tkivo bogato z matičnimi celicami ter da obstajajo primerni protokoli za njihovo izolacijo kar se tudi sklada s strokovno literaturo in dosedanjim delom, ki je bilo opravljeno na tem področju. Potrdili smo tudi da se matične celice pojavljajo v celotnem človeškem telesu vendar je njihovo število dovolj veliko v samo določenih tkivih. Ugotovilo smo da se v Sloveniji že uporabljajo nekateri postopki zdravljenja z matičnimi celicami v določenih celičnih terapijah predvsem se s tem področjem ukvarja Zavod za transfuzijsko medicino Slovenije. Določitev matičnosti celice je zahtevna naloga. V literaturi ni enotne definicije kaj je to matičnost. Splošno sprejeto dejstvo je da je matična celica tista ki vsebuje vsaj 4 specifične površinske označevalce. Zato tudi v našem primeru ne moremo trditi da gre za čisto izolacijo celic, bolj pravilen izraz bi bil bogatenje specifičnih celičnih pod populacij. Pri delu z celicami in različnim tkivom je potrebno biti izjemno pazljiv, saj lahko v določenih primerih pride do kontaminacije tkiva oz. celic in le taksne celice so neuporabne. Ugotovili smo tudi da imajo matične celice le določeno število možnosti rasti kasneje se lahko začnejo oblikovati v bolj specifične celice. Prav tako smo ugotovili da lahko z določenimi rastnimi faktorji pripomoremo k usmerjanju diferenciacije celic v nam želene podskupine celic. Opisali smo teoretično kako bi potekalo zdravljenje s celicami na primeru poškodovanega kolena. Takšni postopki se že uporabljajo v tujini, tudi v Sloveniji jih uporablja nekaj zasebnih klinik. Praktičnega preizkusa zaradi zakonodajnih in praktičnih ovir nismo mogli izvesti, celice smo vzgajali v kulturi in vitro. Izvedli smo številne teste, ter celice tudi pogledali pod mikroskopom. Naredili smo primerjave števila celic ter njihove specifičnosti po dneh. Ugotovili smo da število celic ostaja približno enako vsak dan, da se pa spreminja njihova sestava, bolj ko gremo proti zadnjem dnevu bolj so specifično matične in manj je ostalih pod populacij celic. Ugotovili smo tudi nekaj praktičnih problemov ki se pojavi pri delu z izolacijo celic iz maščobe. To je predvsem mehanske narave saj ima maščoba izjemno veliko gostoto. Potrebno je večkratno izpiranje ter encimska in mehanska razgradnja da dobimo gladko celično suspenzijo primerno za delo. Potrdili smo tudi vse tri delavne hipoteze. S pregledom literature smo ugotovili da je v telesu več primernih virov matičnih celic, opisali smo primer pridobivanja celici iz periferne krvi in kostnega mozga na primeru dela Zavoda za transfuzijsko medicino Ljubljana. Prav tako smo potrdili hipotezo da je adipocitno tkivo primeren vir matičnih celic, saj smo uspeli izolirati in tudi vzgajati matične celice iz adipocitnega tkiva, kar smo tudi predstavili računsko in grafično. Tukaj pa bomo tudi potrdili tretjo hipotezo in sicer smo teoretično poiskali seznam bolezni ki jih je mogoče zdraviti s pomočjo matičnih celic. Seveda na tem seznamu niso našteje vse bolezni saj je z matičnimi celicami mogoče zdraviti še številne druge bolezni. Na tem mestu je potrebno še posebej omeniti zdravljenje različnih nevro degenerativnih bolezni kot je na primer Parkinsonova bolezen za katero trenutno ni poznano nobeno zdravilo. Zaradi staranja svetovnega prebivalstva bo število takšnih bolezni še naprej naraščalo. V spodnji tabeli je predstavljenih nekaj bolezni ki jih je mogoče zdraviti s pomočjo matičnih celic. Potek in uspeh zdravljenja je seveda odvisen od različnih dejavnikov kot so starost pacienta, način izolacije celic, način aplikacije celic, kvaliteta vhodne materiala, izbira ustrezne metode, ustrezna karakterizacija ipd... Preglednica je sestavljena iz naziva bolezni ter odgovor da in ne, da pomeni da je mogoče bolezen zdraviti z matičnimi celicami, ne pomeni za bolezni ni mogoče zdraviti z matičnimi celicami oz da še ni na voljo dovolj podatkov o uspehu zdravljenja. Prav tako je potrebno poudariti da se zdravljenje bolezni dogaja s sočasno uporabo več različnih načinov zdravljenja, npr. levkemija se zdravi s kombinacijo citostaltikov, obsevanja ter presaditve krvotvornih matičnih celic. Posamezne terapije nebi bile učinkovite, kombinacija le teh pa predstavlja veliko učinkovitost in možnost okrevanja pacienta.

Naziv bolezni oz. bolezenskega stanja	DA	NE
Maligni tumorji / neoplazme (Neoplasma malignum / rak C00 - C97)	x	
Levkemija (Leucaemiae C90 - C95)	x	
Mieloproliferativne bolezni (Morbus myeloproliferativus D47.1)	x	
Sladkorna bolezen (Diabetes mellitus DM- E10 - E14)	x	
Bolezen srpastih celic – anemija srpastih celic (Drepanocytosis D57)	x	
Talasemija (Thalassanaemia D56)	x	
Fanconi anemija (Anaemia Fanconi-anaemia aplastica alia D61.0)	x	
Sferocitoza (Sphaerocytosis hereditaria D58.0)	x	
Eliptocitoza (Elliptocytosis hereditaria D58.1)	x	
Blackfan Diamond anemija (aplastična anemija eritroblastopenije - constitutionalis D61.0)	x	
Kombinirana imunska pomanjkljivost - SCID (Immunodeficientia gravis combinata cum numero T - et -B cellularum Parvo D81.1)	x	
Kronična granulomatoza (Granulomatosis chronica-disfunctiones cellularum neutrophilorum polymorphonucleorum D71)	x	
Ataksija teleangiektazija (Ataxia teleangiectasia-ataxia cerebellaris cum defectu DNA G11.3)	x	
Agamaglobulinemija (Agammaglobulinaemia (Bruton) - hypogammaglobulinaemia hereditaria D80.0)	x	
Wiskott-Aldrich sindrom (Syndroma Wiskott-Aldrich D82.0)	x	
Pomanjkanje ADA ali PNP (Deficientia adenosinum - deaminasis D81.3)	x	
Di George sindrom (Syndroma Di George D 82.1)	x	
Glanzmann-Naegeli sindrom (Syndroma Glanzmann-Naegeli, Glanzmann thrombasthenia-Defectus thrombocytorum qualitativi D69.1)	x	
Dedna trombocitopenija (Thrombocytopenia hereditaria-thrombocythaemia essentialis haemorrhagica D47.3)	x	
Dedna teleangiektazija (Teleangiectasia hereditaria haemorrhagica I78.0) (Rendu-Osler-Weberova bolelost)	x	
Storage Pool sindrom (Syndroma Storage Pool-defectus coagulationis)	x	

Levkodistrofija (Laucodystrophiae-disordines metabolismi sphingolipidi et depositionis lipidorum alii E75)	x	
Tay Sachsov sindrom (Syndroma Tay Sachs-gangliosidis GM2 E75.0)	x	
Gaucherjeva bolezen (Morbus Gaucher-sphingolipidosis alia E75.2)	x	
Hurlerjev sindrom (Syndroma Hurler-mucopolysaccharidosis, typus I E76.0)	x	
Hunterjev sindrom (Syndroma Hunter-mucopolysaccharidosis, typus II E76.1)	x	
"Sanphilippo" sindrom (Syndroma Sanphilippo- mucopolysaccharidoses aliis (typus III) E76.2)	x	
Downov sindrom- Trisomija 21 kromosoma (Trisomia 21- Syndroma DownQ90)	x	
Nezelofov sindrom (Syndroma Nezelof D81.4)	x	

Tabela 5: Seznam bolezni, ki jih lahko zdravimo s matičnimi celicami (Vir 3)

Kot posebej zanimivo izmed zgoraj naštetih bolezni bi bilo mogoče izpostaviti zdravljenje Downovega sindroma. Tukaj gre za genetsko motnjo oz. bolezen (kromosomska napaka) nastala kot posledica numerične kromosomske aneuploidije, v kateri je število kopij 21 kromosoma preveliko (celice vsebujejo tri človeške kromosome 21, namesto dveh, ki sta prisotna v normalnih, zdravih celicah in je zato skupno število kromosomov 47). Kariotip s to trisomijo je 47, XX + 21 ali 47, XY + 21. Posledica te aneuploidije je Downov sindrom. Ljudje z Downovim sindromom imajo prepoznavne morfološke značilnosti in tipične zdravstvene probleme. Vsak par ima lahko otroka z Downovim sindromom, vendar je verjetnost, da se otrok rodi s tako motnjo, pri starejših ženskah (nad 35. letom) večja. Pravočasna diagnoza in zdravljenje prirojenih anomalij, lahko takšni osebi podaljša življenje za 50 let in več. Zdravi se z matičnimi celicami pridobljenih iz različnih tkiv, predvsem bi veljalo tukaj omeniti da je uspešnost zdravljenja s pomočjo matičnih celic izoliranih iz lastne popkovnične krvi zelo velika.

Izjemno zanimivo je tudi zdravljenje sladkorne bolezni s pomočjo matičnih celic. V sloveniji za sladkorno boleznijo boleha več kot 40. 000 ljudi. Kronična, neozdravljiva sistemska motnja presnove, za katero je značilna hiperglikemija - trajno povišana raven glukoze v krvi. V glavnem je posledica dednih dejavnikov, nastane pa zaradi zmanjšanega izločanja ali zmanjšanih bioloških učinkov hormona inzulina oz. zaradi kombinacije teh dveh dejavnikov. Ta pomanjkljivost ovira izmenjavo ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin v telesu (kar pripelje do omenjenih težav) in po daljšem času vpliva na zgradbo in delovanje krvnih žil, živcev ter drugih vitalnih organov in organskih sistemov. To je ena izmed najbolj pogostih endokrinih bolezni. Je posledica sodobnega načina življenja in zunanjih dejavnikov, med katerimi izstopa debelost. Najpogostejša je pri starejših, kot posledica splošnih degenerativnih in sklerotičnih sprememb v telesu (ki vplivajo tudi na trebušno slinavko) in pri mladih odraslih kot posledica genetskih nepravilnosti ali poškodb trebušne slinavke pri nekaterih infekcijskih bolezni. Dokazano je bilo da je mogoče z matičnimi celicami spodbuditi delovanje beta celic ki so potrebna za proizvodnjo inzulina.

5. ZAKLJUČEK

Potrjena je bila hipoteza da je mogoče s pomočjo matičnih celic zdraviti številne bolezni, za katere tudi ni več potreben operativni poseg. Prav tako smo potrdili hipotezo da je adipocitno tkivo primeren vir matičnih celic. Potrjena je tudi hipoteza da je mogoče s pomočjo matičnih celic zdraviti številne bolezni. Ugotovili smo da je delo z matičnimi celicami izjemno zahtevno saj zahteva velik spekter znanj ter potrebne opreme. Prav tako je potrebno previdno ravnanje zaradi možnosti kontaminacije. Ugotovili smo tudi da se zdravljenje z matičnimi celicami že izvaja vendar to še vedno ni ustaljena klinična praksa. Potrebno je opraviti še več raziskav na področju zdravljenja s matičnimi celicami da lahko potrdimo njihove učinke na človeško telo.

6. SEZNAM VIROV IN LITERATURE

1. Zdravljenje z matičnimi celicami (Elektronski vir) Dostopno na URL naslovu: <https://www.ekskluzivno.si/zdravje/602-revolucionarno-kaj-nam-prinasa-prihodnost.html> (5.2.2019).
2. Matične celice (Elektronski vir) Dostopno na URL naslovu: <https://kvarkadabra.net/2001/12/maticne-celice/> (5.2.2019).
3. Bolezni ki jih je mogoče zdraviti z matičnimi celicami (Elektronski vir) Dostopno na URL naslovu: <http://www.izvorna-celica.si/o-maticnih-celic/bolezni-ki-se-zdravij-z-maticnimi-celicami/> (5.2.2019).
4. Presaditev krvotvornih matičnih celic (Elektronski vir) Dostopno na URL naslovu: <http://www.ztm.si/terapevtske-storitve/celice-terapije/presaditev-krvotvornih-maticnih-celic/maticne-celice/> (5.2.2019).
5. Milteny Biotech naprava in postopki (Elektronski vir) Dostopno na URL naslovu: <https://www.miltenyibiotec.com/UN-en/products/cell-manufacturing-platform/clinimacs-prodigy.html> (5.2.2019).
6. Zavod za transfuzijsko medicino (Elektronski vir) Dostopno na URL naslovu: <http://www.ztm.si/> (5.2.2019).

7. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Zaradi splošne uporabi in izboljšanja zdravja živali in ljudi je raziskovalna naloga družbeno odgovorna. Pripomogla bo k boljšem razumevanju delovanja matičnih celic in njihovi uporabi, prav tako pa vsebuje informacije, ki bi morda komu lahko pomagali da se raje kot za klasičen operativni poseg odloči za zdravljenje s celično terapijo. V prihodnosti bo mogoče z celičnimi terapijami zdraviti različne vrste bolezni učinkoviteje hitreje, kar bo tudi zmanjšalo obremenitev zdravstvenega sistema tako finančno kot kadrovsko.