Biobanka tkiva i stanica pacijenata s rijetkim nasljednim bolestima u Hrvatskoj

Zekušić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:477670

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

M A R I J A Z E K U Š I Ć

BIOBANKA TKIVA I STANICA PACIJENATA S RIJETKIM NASLJEDNIM BOLESTIMA U HRVATSKOJ

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2015.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Zekušić

BIOBANKA TKIVA I STANICA PACIJENATA S RIJETKIM NASLJEDNIM BOLESTIMA U HRVATSKOJ

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad je izrađen u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti, u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkoga bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof.dr.sc. Ksenije Fumić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

BIOBANKA TKIVA I STANICA PACIJENATA S RIJETKIM NASLJEDNIM BOLESTIMA U HRVATSKOJ

Marija Zekušić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb već dugi niz godina sakupljaju se, izoliraju, analiziraju, skladište i distribuiraju različite vrste bioloških uzoraka (kožni fibroblasti, skeletni mioblasti i različiti humani bioptati pacijenata s rijetkim nasljednim metaboličkim bolestima). Stanične kulture fibroblasta i mioblasta daju mogućnosti proučavanja *in vitro* brojnih svojstava stanica vezivnog tkiva i mišićnih stanica što je izrazito važno za razjašnjavanje brojnih prirođenih i stečenih bolesti, za razumijevanje fizioloških zbivanja u organizmu kao i preduvjet za proučavanje brojnih lijekova. Biološki uzorci se skladište u različite biobanke i nephodni su za dijagnostiku i istraživanje u bilo kojem medicinskom području a posebno u području rijetkih bolesti. Na razini EU uočene su velike razlike u provedbi važećih direktiva, što predstavlja dodatni problem u iskoristivosti uzoraka pohranjenih u biobankama te posljedično umanjuje javnu zdravstvenu korist tih zbirki. Zato se u ovom diplomskom radu opisuje optimizacija metoda prikupljanja, uzgoja, skladištenja i raspodjele humanih fibroblasta, skeletnih mioblasta te bioptata mišića koji u Hrvatskoj otvaraju nove mogućnosti dijagnostike i istraživanja s krajnjim ciljem stvaranja preduvjeta za osnivanje biobanke tkiva i stanica za rijetke bolesti kao i usklađivanje biobanke s europskom biobankom.

Broj stranica: 65 / tablica: 14 / slika: 22 / navoda: 69 / jezik izvornika: hrvatski
Rad je pohranjen u Sveučilišnoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: skeletni mioblasti, kožni fibroblasti, laboratorijska dijagnostika

Voditelj: prof.dr.sc. Ksenija Fumić, FBF Sveučilišta u Zagrebu
Suvoditelj rada: dr.sc. Inga Marijanović, doc. PMF Sveučilišta u Zagrebu
Ocjenjivači: dr.sc. Inga Marijanović, doc. PMF Sveučilišta u Zagrebu
dr.sc. Vesna Benković, izv.prof. PMF Sveučilišta u Zagrebu
dr.sc. Damjan Franjević, doc. PMF Sveučilišta u Zagrebu
Zamjena: dr.sc. Maja Matulić, izv.prof . PMF Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: 5.11.2015. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

TISSUES AND CELLS BIOBANK OF PATIENTS WITH RARE HEREDITARY DISEASES IN CROATIA

Marija Zekušić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Different types of biological samples (skin fibroblasts and skeletal myoblasts, different human biopsy specimens of patients with rare inherited metabolic diseases) have been collected, isolated, analyzed, stored and distributed for many years in Clinical Unit for Hereditary Metabolic Diseases, Department of Laboratory Diagnostics, University Hospital Center Zagreb. Fibroblast and myoblast cell cultures provide the possibility of *in vitro* research of numerous properties of connective tissue and muscular cells, which is particularly important in elucidating many congenital and acquired diseases, for understanding of physiological processes in the body, and as a precondition for studying many medications. Biological samples are stored in different biobanks and are necessary for diagnostics and research in every medical field, particularly in the field of rare diseases. At EU level, considerable differences have been observed in implementation of applicable directives, which is an additional problem in utilization of samples stored in biobanks and which consequently reduces public health benefits from such sample collections. For this reason, this graduation thesis describes optimization of methods for collection, culture, storage, and distribution of human fibroblasts, skeletal myoblasts and muscle biopsy specimens which open in Croatia new possibilities for diagnostics and research with the ultimate goal of creating preconditions for founding a tissue and cell biobank for rare diseases and its harmonization with European biobank.

(pages: 65 / tables: 14 / figures: 22 / references: 69 / original in: Croatian)
Thesis deposited in the central Biological Library
Key words: skeletal myoblasts, skin fibroblasts, laboratory diagnostic

Supervisor: dr. Ksenija Fumić, Prof., Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Cosupervisor: dr. Inga Marijanović, Asst.Prof., Faculty of Science, University of Zagreb
Reviewers: dr. Inga Marijanović, Asst.Prof., Faculty of Science, University of Zagreb
dr. Vesna Benković, Assoc.Prof., Faculty of Science, University of Zagreb
dr. Damjan Franjević, Asst.Prof., Faculty of Science, University of Zagreb
Replacement: dr. Maja Matulić, Assoc.Prof., Faculty of Science, University of Zagreb

Thesis accepted: 05.11.2015.

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Kseniji Fumić koja je profesionalnim vodstvom doprinijela kvaliteti ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem suvoditeljici doc.dr.sc. Ingi Marijanović koja me je izvrsnim predavanjem o humanim matičnim stanicama dodatno inspirirala za pisanje ovog rada.

Iskreno zahvaljujem na suradnji dr.sc. Oliveru Vugreku voditelju IPA-projeka na Institutu „Ruđer Bošković" u Zagrebu u sklopu kojega sam prvi puta izolirala humane matične stanice skeletnog mišića zajedno sa kolegicom Željkom Majić, mag. kemije.

Ovom prilikom bih istaknula veliku potporu i jako dobru poslovnu suradnju između kliničkog osoblja iz Zavoda za bolesti metabolizma KBC Zagreb, prof.dr.sc. Ive Barića i Danijele Petković Ramadža, dr.medicine i djelatnika Odjela za laboratorijsku dijagnostiku metabolikih bolesti a sve u interesu zdravlja pacijenata.

Veliko hvala kolegicama i prijateljicama dr.sc. Ivani Tonković i dr.sc. Kristini Crikvenac na pomoći oko izrada slika matičnih stanica.

Također se zahvaljujem svom divnom suprugu na potpori tijekom studiranja, sestri Steli i mojim roditeljima koji su uvijek vjerovali u mene.

Rad posvećujem svojim sinovima Petru i Franu s porukom:
„Work hard in silence, let success make the noise"

SAŽETAK

ABSTRACT

SKRAĆENICE

1. UVOD

1.1. POVIJEST ISTRAŽIVANJA MATIČNIH STANICA 1

1.2. MATIČNE STANICE 3

1.2.1. Embrionalne matične stanice..... 3

1.2.2. Inducirane pluripotentne matične stanice..... 5

1.2.3. Tkivne matične stanice 6

1.2.3.1. Mioblasti izolirani iz skeletnog mišića……..... 8

1.2.3.2. Fibroblasti u dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti..... 9

1.3. BIOBANKE TKIVA I STANICA 10

1.3.1. Kodeks korištenja ljudskih matičnih stanica 11

1.4. STANDARDI NEOPHODNI ZA UZGOJ HUMANIH STANICA 13

1.4.1. Dobra laboratorijska praksa ……..... 13

1.4.1.1. Laboratorij biosigurnosne razine 1 14

1.4.1.2. Laboratorij biosigurnosne razine 2..... 14

1.4.1.3. Laboratorij biosigurnosne razine 3..... 17

1.4.2. Dobra proizvođačka praksa ……..... 18

1.5. RIJETKE BOLESTI 19

1.5.1. Lizosomske bolesti nakupljanja..... 19

1.5.1.1.Mukopolisaharidoze..... 21

1.5.1.2. Sfingolipidoze..... 23

1.5.2. Mitohondrijski poremećaji stvaranja energije..... 24

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

3. MATERIJALI I METODE 28

3.1. ISPITANICI..... 28

3.2. MATERIJALI..... 28

3.2.1. Pribor..... 28

3.2.2. Oprema..... 29

3.2.3. Popis otopina..... 29

3.3. METODE
3.3.1. Zajednički sigurnosni aspekti rada s humanim kulturama stanica..... 29
3.3.2. Izolacija fibroblasta..... 30
3.3.2.1. Transport uzorka kože..... 31
3.3.2.2. Primarna kultura fibroblasta..... 31
3.3.2.3. Tripsinizacija fibroblasta..... 31
3.3.2.4. Sekundarna kultura fibroblasta..... 32
3.3.2.5. Brojanje stanica..... 32
3.3.3. Izolacija mioblasta..... 32
3.3.3.1. Priprema medija za uzgoj mioblasta..... 32
3.3.3.2. Transpost uzoraka mišića..... 33
3.3.3.3. Primarna kultura mioblasta..... 33
3.3.3.4. Tripsinizacija mioblasta..... 35
3.3.3.5. Sekundarna kultura mioblasta..... 35
3.3.3.6. Pročišćavanje mioblasta..... 35
3.3.3.7. Diferencijacija mioblasta u miotube..... 36
3.3.4. Metoda protočne citometrije…….. 36
3.3.5. Pohrana bioloških uzoraka 37
3.3.5.1. Kratkotrajno zaleđivanje stanica na -80 °C..... 37
3.3.5.2. Dugotrajno zaleđivanje stanica na -196 °C..... 37
3.3.6. Zaleđivanje bioptata..... 38

4. REZULTATI

4.1. KULTURA FIBROBLASTA..... 39
4.2. KULTURA MIOBLASTA..... 41
4.3. DIFERENCIJACIJA MIOBLASTA U MIOTUBE…….. 43
4.4. DIJAGNOSTIKA LIZOZOMSKIH BOLESTI NAKUPLJANJA..... 43
4.5. PRIKAZ BAZE PODATAKA..... 45
4.6. VANJSKA PROCJENA KONTROLE KVALITETE..... 46
4.7. SAKUPLJENI BIOLOŠKI UZORCI..... 46

5. RASPRAVA

5.1. ISTRAŽIVANJE NA MATIČNIM STANICAMA…….. 47

5.2. MATIČNE STANICE U MEDICINI…….. 47
5.3. ORGANIZACIJA BIOBANKI TKIVA I STANICA……. 49
5.3.1. Značaj biobanki…….. 49
5.3.2. Povjerljivost podataka……. 50
5.3.3. Distribucija uzoraka ……... 50
5.3.4. Kontrola kvalitete i neophodni uvjeti za uspostavljanje biobanke…….. 51

6. ZAKLJUČAK

7. POPIS LITERATURE

8. PRILOZI

Prilog 1. Metaboličke bolesti i međunarodna klasifikacija ICD-10 …… 59
Prilog 2. Primjer informiranog pristanka pacijenta za biopsiju mišića na KBC Zagreb 61
Prilog 3. Primjer informiranog pristanka pacijenta u EU…….. 63
ŽIVOTOPIS……. 64

SKRAĆENICE

BSC	Biološki zaštitini kabinet, engl *Biological Safety Cabinet*
CK	Kreatinin kinaza
DMEM	Dulbekov medij s visokom dozom glukoze, engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DPBS-CMF	Dulbekov fosfatni pufer bez Ca^{+2} i Mg^{+2}, engl. *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline Calcium and Magnesium Free*
DMSO	Dimetilsulfoksid
EBB	Europska biobanka, engl. *EuroBioBank*
EGF	Epidermalni faktor rasta, engl. *Epidermal Growth Factor*
EMA	Europska agencija za lijekove, engl. *European Medicine Agency*
ER	Endoplazmatski retikul
ESCS	Embrionalne matične stanice, engl. *Embryonic Stem Cells*
ERNDIM	Europske kontrole kvalitete u području nasljednih metaboličkih bolesti (engl. *European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolis*
EURORDIS	Europska organizacija za rijetke bolesti, engl. *European Organization for Rare Diseases*
FBS	Fetusni goveđi serum, engl. *Fetal Bovin Serum*
FDA	Administracija za hranu i lijekove, engl. *Food and Drug Administration*
FGF	Faktor rasta fibroblasta, engl. *Fibroblast Growth Factor*
GAG	Glikozaminoglikan
GLP	Dobra laboratorijska praksa, engl. *Good Laboratory Practice*
GMP	Dobra proizvođačka praksa, engl. *Good Manufacturing Practice*
HESCS	Ljudske embrionalne matične stanice, engl. *Human Embryonic Stem Cells*
HEPA	Visoko efikasni filter, engl. *High efficiency particulate air*
HIPSCS	Ljudske inducirane pluripotentne matične stanice, engl. *Human Induced Pluripotent stem cells*
ICD 10	Međunarodne klasifikacije bolesti, engl. *International Classification of Diseases*-10
KZLD	Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
MPS	Mukopolisaharidoze
M6P	Manoza 6 fostat, engl. *Mannose 6-phosphate*
MSC	Mikrobiološki zaštitini kabinet, *engl. Microbiological Safety Cabinet*.
MFI	Miogenski fuzijski indeks, engl. *Myogenic Fusion Index*
MACS	Magnetski separator, engl. *Magnetic-activated cell sorting*
OMIM	engl. *Online Mendelian Inheritance in Man*
SAHH	S-adenozil-homocistein hidrolaza
SGM	Medij za rast stanica skeletnog mišića, engl. *Skeletal Muscle Cell Growth Medium*
SOP	Standardni operativni postupak
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, engl. *World Health Organisation*

1. UVOD

Biološki uzorci i baza podataka u biobanci tkiva i stanica su jako bitni za razumijevanje i liječenje svih rijetkih bolesti uključujući i pacijente s nasljednim bolestima koji umiru u ranim godinama života. Biološke materijale poput urina, pune krvi, plazme, leukocita, DNA, staničnih linija i bioptata, trebalo bi skladištiti u biobanku s ciljem dijagnostike, terapije i istraživanja. Uskladišteni biološki materijal pacijenata s rijetkim metaboličkim bolestima omogućava istraživanja i bolje razumijevanje genetske podloge bolesti. Mnogi pacijenti s rijetkim bolestima imaju zajedničke simptome, ali za prepoznavanje vrste bolesti i pravovremenu terapiju neophodna je suradnja vrhunskih stručnjaka, od liječnika na odjelu do genetičara, biokemičara i molekularnih biologa u laboratoriju.

U posljednjih nekoliko godina, matične stanice su često prikazane u javnosti kao novi način terapije kojom bi se mogli obnoviti gotovo svi oštećeni organi i tkiva u ljudskom tijelu. Jesu li uistinu matične stanice novi model u otkrivanju novih lijekova, jesu li novi terapeutski pristup i kakav je njihov utjecaj u dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti?

1.1. POVIJEST ISTRAŽIVANJA MATIČNIH STANICA

Prvi u povijesti koji je istraživao matične stanice bio je njemački znanstvenik Ernst Haechel koji je još 1868. godine proučavao evoluciju više različitih vrsta životinja, uključujući i rakove i otkrio jedinstvenu sposobnost stanica koje se mogu replicirati i istovremeno proizvesti diferencirane vrste stanica. Nazvao ih je 'stammzelle" što na njemačkom jeziku znači matična stanica (Haeckel 1868). Takva zapažanja dokazana su u zadnje vrijeme kod jetre koja se može regenerirati i nakon što je 70% kirurški uklonjena. Ovaj postupak se pripisuje matičnim stanicama u tom organu. Dakle, matične stanice koje se nalaze u organima odraslih osoba nazivaju se tkivne matične stanice (engl. *Adult Stem Cells*). Najviše istraživane tkivne matične stanice su hematopoetske stanice. Prva klinička primjena odnosno terapija matičnim stanicama zabilježena je u području transfuzije krvi, a za otkriće stečene imunološke reakcije biolog Peter Medawar je dobio Nobelovu nagradu za medicinu (Medawar 1960). Nakon ove kliničke primjene nastavljeno je istraživanje šire primjene matičnih stanica iz kože u liječenju opeklina, matičnih stanica iz rožnice za oštećenje na očima i moždane matične stanice u

slučajevima moždanog udara. U isto vrijeme kada su objavljena istraživanja na odraslim matičnim stanicama, započela su istraživanja na embrionalnim matičnim stanicama *(*engl. *Embryonic Stem Cells*, ESCs). Tijekom 1960-ih i 70-ih godina, znanstvenici su uočili na testisima pojavu teratokarcinoma tj. tumorske mase koja nije sadržavala samo stanice tkiva testisa nego i kosu, kosti, neurone i drugo. Uzrok tih neobičnih tumora nastaje uslijed zaostataka embrionalnih matičnih stanica u tkivu testisa koje su mutirale. Istraživanja na matičnim stanicama nastavljena su 1981. godine izolacijom embrionalnih matičnih stanica iz embrija miša. Ove stanice se mogu uzgajati u laboratorijskim uvjetima duži vremenski period i iz njih može nastati bilo koja od 200 različitih stanica miša. Takve stanice se mogu genetski modificirati. To otkriće doprinijelo je našem temeljnom razumijevanju genetike i nastanka bolesti što je rezultiralo dodjeljivanjem Nobelove nagrade za medicinu i fiziologiju skupini istraživača: Maria Capecchi, Martina Evans i Olivera Smithies 2007. godine u području humane genetike i stanične biologije (Peschanski 2008).

Veliko otkiće nastalo je 1998. godine kada su prvi put izolirane ljudske embrionalne matične stanice (engl. *Human Embryonic Stem Cells*, hESCs). Trebalo je 17 godina da se izoliraju ljudske embrionalne matične stanice jer su zahtijevale drugačije uvjete rasta u odnosu na stanice miša i zbog etičkih razloga u radu s ljudskim embrijima. Dakle, hESCs mogu biti proizvedene samo od rezervnih embrija nakon što su parovi prošli kroz proces fertilizacije *in vitro*. Jedno od najvažnijih otkrića nastalo je nakon istraživanja Keith Campbell kloniranjem ovce Dolly 1997. godine. Ovaj rad opovrgnuo je teoriju da je razvoj jednosmjeran tj. da iz embrija nastaje fetus, a od fetusa odrasla osoba. Stanica dobivena transferom jezgre transplantirana je u surogat majku rezultirajući s ovcom Dolly (Campbell i sur. 1996). Na ovom otkriću neumorno su radili mnogi znanstvenici kako bi istražili postoji li mogućnost u laboratoriju da od različitih somatskih stanica (kao što su recimo stanice kože) nastanu matične stanice, ali bez potrebe za nuklearnim prijenosom iz oplođene jajne stanice, što predstavlja ozbiljan etički problem u mnogim zemljama. Senzacionalno otkriće nastalo je 2006. godine kada su Shinya Yamanaka i njegovi suradnici pokazali kako se kožne stanice miša mogu reprogramirati u pluripotentne matične stanice dodavanjem samo 4 transkripcijska faktora Oct4, SOX2, Klf4 i cMyc (Takahashi i Yamanaka 2006). U 2007. godini, Yamanaka je nastavio dokazivati ovaj proces ponavljajući eksperiment na ljudskim stanicama nazivajući ih ljudske inducirane pluripotentne matične stanice (engl. *Human Induced Pluripotent stem cells*, hiPSCs). Otkrićem matičnih stanica otvaraju se nove

spoznaje i mogućnosti boljeg razumijevanja bolesti, razvoja novih lijekova ili potencijalne primjene u genetskoj terapiji.

1. 2. MATIČNE STANICE

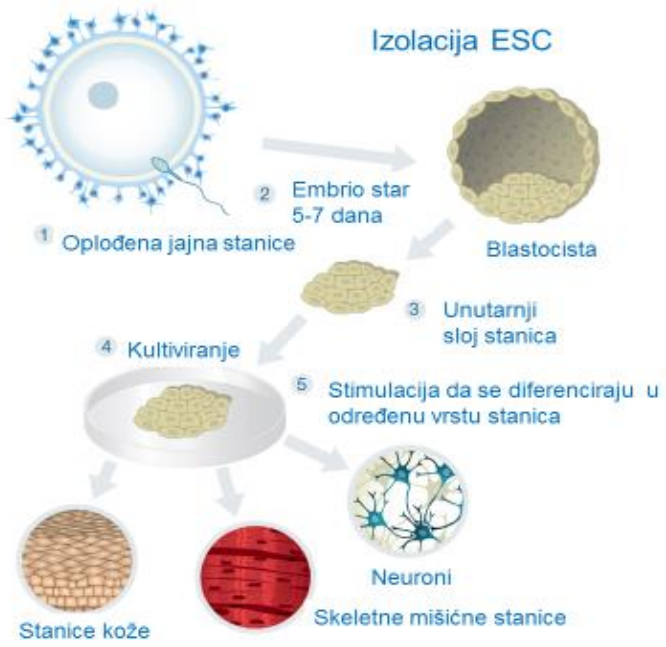
Matične stanice za razliku od drugih vrsta stanica imaju dvije važne karakteristike. Prva je sposobnost dijeljenja u jednu stanicu s istim potencijalom dijeljenja i u drugu stanicu koja ima više specijalizirane karakteristike s manjim potencijalom dijeljenja. Druga karakteristika podrazumijeva da pod određenim fiziološkim uvjetima mogu postati tkivno specifične matične stanice koje imaju znatan potencijal razvijanja u mnogo različitih vrsta stanica tijekom ranog rasta i razvoja (Morrison i sur. 1997; Till i McCulloch 1980; Weissman 2000). U mnogim tkivima služe kao neka vrsta internog sustava za popravak, dijeleći se bez ograničenja. Tijekom tog procesa dijeljenja, svaka matična stanica ima potencijal da ostane matična stanica ili uđe u proces diferenciranja sa više specijaliziranih funkcija kao što su mišićne stanice, eritrociti ili stanice mozga. Međutim, u nekim organima kao što su koštana srž i intestinum, matične stanice se tijekom cijeloga života redovito dijele s ciljem zamjene istrošenih stanica ili popravka oštećenog tkiva. Matične stanice se također dijele prema njihovim mogućnostima diferencijacije na totipotentne, pluripotentne, multipotentne i unipotentne, odnosno progenitorske stanice. Totipotentne stanice se mogu diferencirati u sve tipove stanica, uključujući ekstra embrionalne strukture. Pluripotentne stanice se mogu diferencirati u sve tipove stanica iz ektoderma, mezoderma i endoderma. Multipotentne stanice se mogu diferencirati u stanice pojedinog tkiva te sudjeluju u regeneraciji i popravku.

1.2.1. Embrionalne matične stanice

Embrionalne matične stanice su stanice nastale iz stadija blastociste odnosno uzgojene u laboratoriju iz stanica ranog stadija embrija i imaju sposobnost razvijanja u bilo koji tip stanica ili tkiva (Slika 1). Većina ESCs dobivene su iz embrija koji su oplođeni *in vitro* u klinici i onda donirani za istraživačke svrhe. Kod embrija starog od 3 do 5 dana (tzv. blastocista) unutarnji sloj stanica dovodi do razvoja cijelog organizma uključujući specijalizirane vrste stanica i organe kao što su spolne stanice, srce, pluća, koža i druge (Mummery i sur. 2003). Prema EuroStemCell organizaciji embrionalne matične stanice imaju neograničen potencijal stvaranja specijaliziranih stanica u tijelu,

što upućuje na ogromne mogućnosti istraživanja različitih bolesti i za primjenu novih terapija (www.eurostemcell.org).

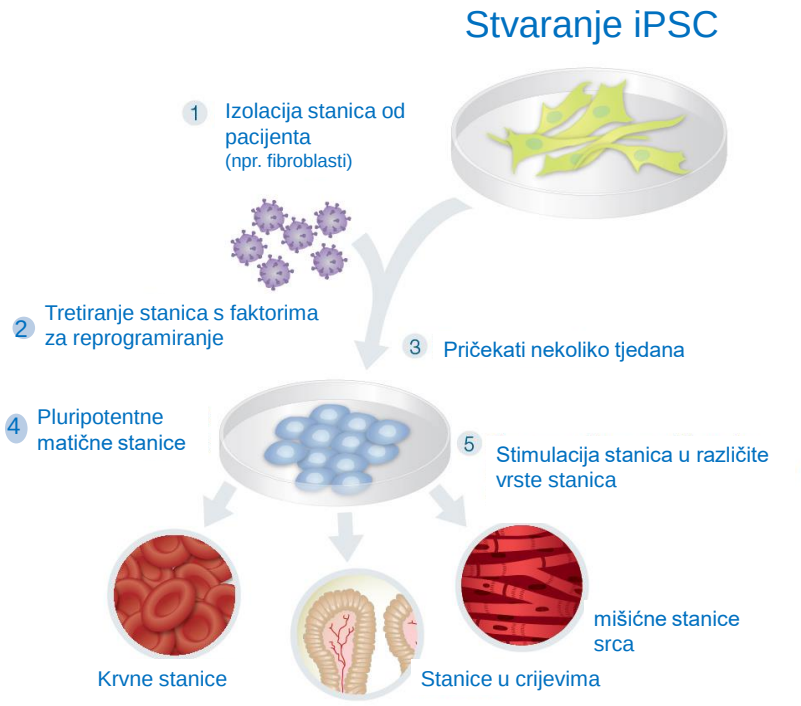
Znanstvenici su 1981. godine prvi put dobili embrionalne matične stanice iz ranog stadija razvoja miša dok su ljudske ESCs 1998. godine prvi put uzgojene *in vitro* u laboratoriju. Ljudski embriji koji su korišteni u svrhu istraživanja, stvoreni su za reproduktivne svrhe, odnosno za proces fertilizacije *in vitro*. U situacijama kada više nisu bili potrebni za oplodnju, donirani su za istraživanje uz informirani pristanak pacijenta. ESCs se mogu mjesecima uzgajati i rasti u subkulturi u plastičnim kultivacijskim posudama a da se ne diferenciraju no pokazuju mogućnost stvaranja embrioidnih tijela i tumora (Stevens i sur. 1954). Nekoliko godina kasnije to je dokazano (Kleinsmith 1964; Martin i Evans 1974). Moguća je provjera matičnih stanica nakon rasta u primarnim kulturama, subkulturama i nakon zamrzavanja korištenjem transkripcijskih faktora za nediferencirane stanice. Embrionalne matične stanice proizvode transkripcijske faktore Nanog i Oct4 specifične za nediferencirane stanice (Loh i sur. 2006). Međutim, korištenje embrionalnih matičnih stanica za terapijske ili istraživačke svrhe potiče ozbiljna etička pitanja s obzirom da je za uzgoj matičnih stanica neophodno uništiti embrij. Iako primjena ljudskih embrionalnih matičnih stanica za istraživanje mora zadovoljavati stroge zahtjeve kvalitete i etička pitanja, iz svih ovih razloga odobrene su za uporabu u vrlo malom broju kliničkih ispitivanja.



Slika 1. Embrionalne matične stanice
preuzeto i prilagođeno sa http://www.learn.genetics.utah.edu

1.2.2. Inducirane pluripotentne matične stanice

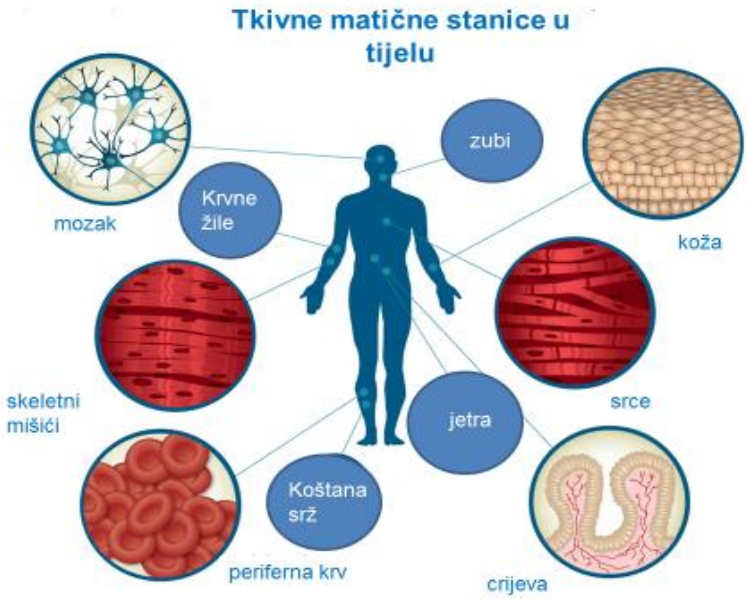
Znanstvenici su 2006. godine napravili iskorak u istraživanju matičnih stanica gdje su kod miša otkrili kako se specijalizirane odrasle stanice kao što su kožni fibroblasti mogu "reprogramirati" u stanice koje se ponašaju kao embrionalne matične stanice, te su nazvane inducirane pluripotentne matične stanice (Takahashi i Yamanaka 2006). Nastavljeno je istraživanje i na ljudskim matičnim stanicama i prvi rezultati su objavljeni krajem 2007. godine (Takahashi i sur. 2007). Otkriće iPSCs usmjerilo je istraživanje u pravcu primjene pacijentovih reprogramiranih fibroblasta kako bi liječili bolesti, izbjegavajući opasnost od imunološkog odbacivanja (Slika 2). Međutim, korištenje iPSCs u staničnim terapijama još nije u kliničkoj primjeni. Kako se virusi koriste za uvođenje faktora reprogramiranja, proces mora biti strogo kontroliran prije nego se metoda bude koristila za kliničku primjenu na ljudima. Američki Nacionalni institut za zdravlje ističe da je pred znanstvenicima zadatak da pronađu načine za proizvodnju iPSCs na način da budu sigurni za pacijenta. Sadašnje metode uključuju mogućnost genetskih modifikacija, koje ponekad mogu rezultirati stvaranjem stanica tumora. Zbog toga se iPSCs zasad koriste u istraživanju novih lijekova, a znanstvenici se nadaju da će uskoro biti moguće koristiti iPSCs u transplantacijskoj medicini (www.eurostemcell.org).



Slika 2. Inducirane matične stanice
preuzeto i prilagođeno s www.learn.genetics.utah.edu

1.2.3. Tkivne matične stanice

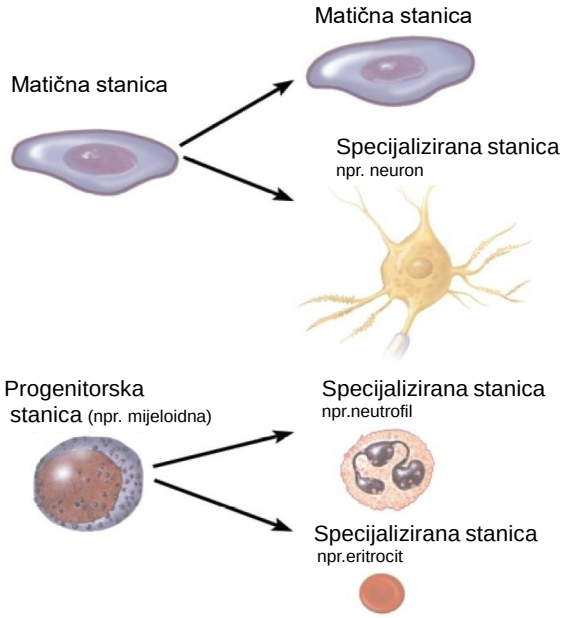
Odrasle osobe imaju matične stanice koje su nediferencirane, a koje se nalaze između diferenciranih stanica u mnogim tkivima i organima. Tkivne ili somatske matične stanice (engl. *Adult stem cells*) imaju mogućnost samoobnavljanja i mogu se diferencirati u specijalizirane stanice za neko tkivo ili organ. Primarna uloga odraslih matičnih stanica u organizmu odrasle osobe je održavanje i popravak tkiva u kojem se nalaze. Znanstvenici koriste naziv i somatske matične stanice jer se mogu naći u tkivu odraslih osoba. U tkivne matične stanice spadaju hematopoetske, neuralne, mezenhimske stanice, skeletni mioblasti, kardiomiocite, matične stanice u intestinumu i germinativne matične stanice (Slika 3). Mnoga tkiva u ljudskom tijelu imaju mogućnost regeneracije i održavanja tijekom života korištenjem matičnih stanica. Adultne matične stanice se mogu diferencirati u različite vrste tkiva, ali nemaju takvu proliferativnu sposobnost poput embrionalnih matičnih stanica.



Slika 3. Tkivne matične stanice u tijelu
preuzeto i prilagođeno s www.learn.genetics.utah.edu

Kako se diferencijacija odraslih matičnih stanica može kontrolirati u laboratorijskim uvjetima, mogu postati stanice koje se koriste za terapiju baziranu na matičnim stanicama. Prve u povijesti koje su klinički primijenjene bile su matične stanice iz koštane srži. Istraživanja na tkivnim matičnim stanicama započela su još 1950. godine kada su znanstvenici otkrili najmanje dvije vrste matičnih stanica - hematopoetske matične stanice koje mogu regenerirati krvne stanice i mezenhimske matične stanice koje mogu regenerirati kosti i hrskavicu (Wagner i sur. 2005).

Terapija matičnim stanicama u rutinskoj je uporabi od 1970-ih. Transplantacija koštane srži je u mogućnosti zamijeniti pacijentov oboljeli krvni sustav, zahvaljujući svojstvima matičnih stanica iz krvi. Tisuće pacijenata svake godine koristi ovu vrstu liječenja. Općenito, odrasle matične stanice ostaju u fazi mirovanja i aktiviraju se tek kod ozljede ili oštećenja tkiva. Stupanj oštećenja tkiva može određivati stupanj aktivacije matičnih stanica i sudjelovanja u odgovoru na povredu. Prekusorske stanice su dostupne za homeostazu, dok više potentne matične stanice ostaju mirovati dok se ne desi ozbiljnija ozljeda. Postoje i unipotentne matične stanice koje se nalaze u tkivima, što znači da se mogu diferencirati u jednu vrstu stanične populacije (Slika 4).



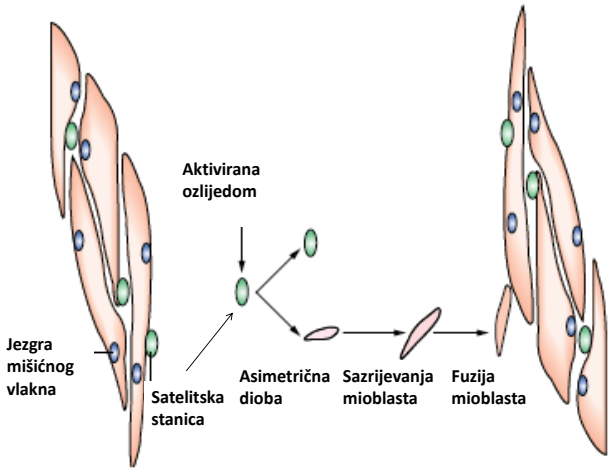
Slika 4. Matična i progenitorska stanica
preuzeto i prilagođeno s www.systemsbiology.org.au

Provjera i identifikacija populacije matičnih stanica iz raznih tkiva ovisi o specifičnim biljezima, odnosno specifičnim proteinima. Za razliku od embrionalnih matičnih stanica koje proliferiraju, većina odraslih matičnih stanica su u stanju mirovanja. Odrasle matične stanice borave u stanju mirovanja u različitim tkivima u tzv. nišama. Niše matičnih stanica su ograničeno i specijalizirano područje gdje borave matične stanice, npr. u koštanoj srži se nalaze hematopoetske i mezenhimske matične stanice, u mozgu se nalaze neuralne matične stanice, u koži točnije u folikulu dlake se nalaze epidermalne matične stanice, a u skeletnom mišiću se nalaze satelitske matične stanice. Smatra se da odrasle matične stanice ostaju u stanju mirovanja kako bi se

izbjeglo oštećenje stanica s kisikovim slobodnim radikalima i osiguralo cjeloživotnu sposobnost obnavljanja tkiva (Rossi i sur. 2008).

1.2.3.1. Mioblasti izolirani iz skeletnog mišića

Skeletni mišić se sastoji od mišićnih stanica tj. mioblasta koje se udružuju u miofibrile i kasnije u mišićna vlakna. Funkcionalna svojstva skeletnih mišića ovise o međusobnom odnosu mišićnih vlakana, motornih neurona, krvnih žila i vezivnog tkiva. Zrela funkcionalna stanica skeletnog mišića, okružena je satelitskim stanicama koje se nalaze izvan sarkoleme, ali unutar bazalne membrane (Slika 5). Satelitske stanice koje su nastale od zajedničke prekusorske stanice prvi je opisao Mauro 1961. godine na temelju njihovog položaja i morfologije. Elektronskom mikroskopijom uočeno je da postoje stanice koje leže na površini mišićnog vlakna ispod bazalne membrane, ali na njegovoj perifernoj stani zbog čega su dobile naziv "satelitske" stanice (Mauro 1961; Scharner i Zammit 2011).

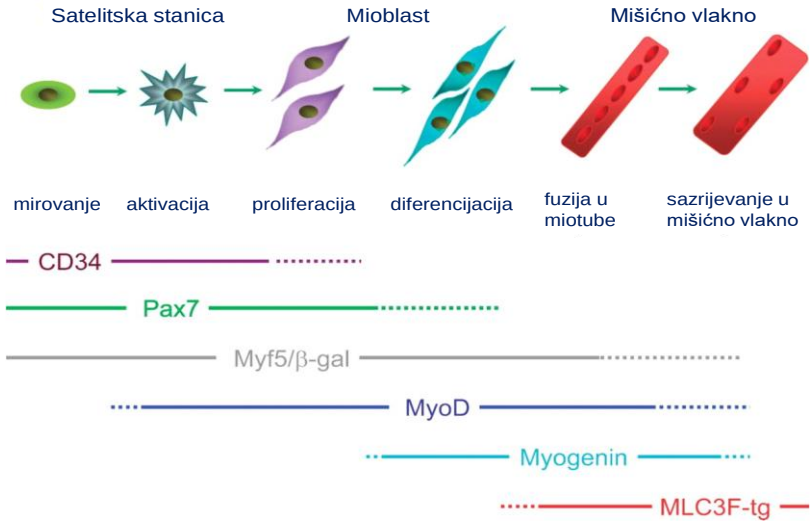


Slika 5. Satelitske stanice
preuzeto i prilagođeno s www.medscape.com

Općenito, matične/progenitorske stanice su identificirane i karakterizirane u pogledu molekularnih markera, zahvaljujući kojima se mogu pratiti unutar tkiva, niše. Radioaktivno označene satelitske stanice su dovele do razumijevanja njihove uloge u regeneraciji mišića (Lipton i Schultz 1979). Satelitske stanice u odraslom mišiću ostaju u stanju mirovanja dok će ih vanjski podražaji potaknuti u ponovni ulazak u stanični ciklus. Mioblasti se udružuju i stvaraju novo multinuklearno mišićno vlakno (Bischoff 1994). Stanični površinski markeri povezani su sa staničnim satelitskim stanicama, bilo

da su u stanju mirovanja ili su aktivirani i uključuju M-kadherin, C-met i CD34 **(**Cornelison i Wold 1997; Stern-Straeter i sur. 2007; Zammit i sur. 2006) (Slika 6).

Dakle, mišićne satelitske stanice prvi put su opisane i dobile su ime na osnovu anatomske lokacije ispod bazalne membrane koja okružuje svako mišićno vlakno (Zamitt i sur. 2006). Nakon ovog otkrića elektronski mikroskop je omogućio definitivnu identifikaciju. U zadnje vrijeme opisano je nekoliko molekularnih markera sa kojima se mogu detektirati satelitske stanice, čineći ih mnogo pristupačnijima za studije na razini svjetlosnog mikroskopa (Kassar-Duchossoy i sur. 2004). Aktivacija mioblasta nakon ozljede mišića ili mišićnih bolesti je važan korak u procesu regeneracije mišića. Tijekom regeneracije mišića mioblasti ulaze u proliferacijski proces, na kraju kojeg se većina mioblasta diferencira i spoji u miotube (Kislinger i sur. 2005).



Slika 6. Diferencijacija mioblasta s biljezima
preuzeto i prilagođeno iz Zamitt i sur., 2006

Objavljeni su uvjerljivi dokazi metode kako će iz satelitskih stanica izravno nastati mioblasti (Bischoff 1975; Rosenblatt i sur. 1995). U tim studijama, mišićno vlakno je izolirano iz mišića enzimatskom digestijom, zajedno s njihovom skupinom matičnih satelitskih stanica.

1.2.3.2. Fibroblasti u dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti

Kultura fibroblasta je neophodna kod analize nasljednih metaboličkih bolesti bilo da se biopsija uzima od živih osoba ili post mortem. Fibroblasti su neprocjenjivi u potvrdi mnogih metaboličkih poremećaja, a stanice se mogu zamrznuti u biobanke za

potencijalne buduće analize. Koža je lako dostupna, i dobivanje biopsije je relativno neinvazivno u odnosu na druge tkivne biopsije. Kultura fibroblasta također pruža važan referentni materijal za buduću prenatalnu dijagnostiku za određenu obitelj te služi kao izvor mRNA za više detaljne molekularne studije. Bilo da postoji ili ne postoji postavljena dijagnoza, zamrznuti fibroblasti pružaju mogućnost za buduća istraživanja s ciljem većeg razumijevanja etiologije nasljednih metaboličkih bolesti (Fratantoni i sur. 1968). Prema protokolu u Dječjoj bolnici u Sheffield biopsija kože bi trebala biti rutinski dio svakog analiziranja *post mortem* (autopsija) gdje je dojenče ili dijete umrlo od nepoznatog uzroka i gdje je postojala realna mogućnost nastanka metaboličkog poremećaja. Posebnu pažnju treba posvetiti sterilnosti biopsije kože. Preporuka je napraviti biopsiju s različitih mjesta u roku od dva sata od smrti, a uzorke biopsije ostaviti u sterilne epruvete s hranjivim medijem. Patolozima se preporučuje da naprave biopsiju kože metodom "punch". Prihvatljivo je uzeti dva manja uzorka biopsije veličine 2 mm x 2 mm pune debljine kože. Preporuka je napraviti biopsiju kože što ranije post mortem iako se koža za kulturu fibroblasta može uzeti i 2 do 3 dana nakon smrti. Mogućnost kontaminacije se povećava u slučajevima uzimanja biopsije sa zakašnjenjem. Nakon što su obavljene biopsije, uzorke bioptata je potrebno odmah poslati u laboratorij za staničnu kulturu. U slučaju da se koža ne može odmah procesuirati, uzorci biopsije se mogu pohraniti preko noći na +4 °C (ali nikada zamrzavati bioptat jer to će uništiti vijabilnost stanica (www.sheffieldchildrens.nhs.uk).

1.3. BIOBANKE TKIVA I STANICA

Biobanke su organizirane zbirke pohranjenih bioloških uzoraka kao što su humana DNA, tkiva i stanice. Primarno su osmišljene u dijagnostičke svrhe, no u zadnje vrijeme prepoznate su kao ključne zbirke za znanstvena istraživanja i razvoj novih terapija. EuroBioBank (EBB) je europska mreža bioloških banaka osnovana 2001. godine (www.eurobiobank.org). EuroBioBank mreža u potpunosti je organizirana u pravcu istraživanja rijetkih bolesti omogućavajući pristup kvalitetnim ljudskim biološkim uzorcima. Na razini Europske Unije na Orphanet web stanici uočava se da je u zadnjem desetljeću organizirano 138 različitih biobanki (www.orpha.net). U području rijetkih bolesti broj dostupnih uzoraka je općenito vrlo ograničen. Dijeljenje uzoraka i podataka unutar biobanki EU neophodno je za otkrivanje patoloških mehanizama nastanka bolesti i razvoj novih terapija. Uključivanje novih biobanki u zajedničku EBB

pridonijelo bi povećanju broja uzoraka kojih je u zadnje vrijeme više od 500 000 dostupno preko mreže, 73 400 uzoraka je distribuirano, a u prosjeku se godišnje distribuira oko 7 000 uzoraka, iz čega je proizašlo 120 znanstvenih članaka priznajući doprinos EBB u daljnjem napretku u liječenju rijetkih i neuromuskularnih bolesti (www.eurobiobank.org). Posebna pažnja se posvećuje kontroli kvalitete korištenjem standardnih operativnih postupaka (SOP). Glavni ciljevi EU u području rijetkih bolesti su ostvarivanje bolje međusobne suradnje zemalja članica, usklađivanje i umrežavanje u zajedničku EuroBioBanku (Mora i sur. 2014). Međutim, trenutno stanje u europskim biobankama pokazuje značajnu neusklađenost tehničkih zahtjeva (uvjeti skladištenja, prikupljanja i raspodjele uzoraka) te pravnih zahtjeva (zaštita prava pacijenata i informirani pristanak). Ukratko, pojavila se potreba za harmonizacijom i usklađivanjem svih standardnih operativnih postupaka (SOP) vezanih uz biobanke (Monaco i sur. 2015; Riegman i sur. 2008; Yuille i sur. 2008).

1.3.1. Kodeks korištenja ljudskih matičnih stanica

Biološki materijal koji je bio sakupljan za različite namjene dugi niz godina donosi potrebu definiranja da li se skladište biološki uzorci za terapeutske ili istraživačke svrhe ili za oboje. Ovo sakupljanje bioloških uzoraka u spremnicima danas je poznato kao biobanka. Mogu biti različite prirode u ovisnosti o specifičnom tipu skupljanja i namjene. Biobanka koja je organizirana za istraživačke svrhe mora osiguravati: privatnost donora, kvalitetu uzorka, mogućnost skladištenja uzorka na duže vrijeme te pravilno korištenje i distribuciju uzoraka (Yuille i sur. 2010). Etičko pitanje uključuje moralni status ljudskog embrija, dignitet ljudske osobe i porijeklo tkiva ljudskog tijela. Postoji više vrsta biobanki ovisno o tipu biološkog materijala, etičkim pitanjima i različitim kriterijima. U biobanci je neophodno definirati način dobivanja uzorka ljudskog tijela odnosno je li uzorak dobiven sa svrhom čuvanja matičnih stanica kao u slučaju krvi iz pupkovine ili je sakupljan kao materijal viška (ostatak). Trebalo bi istaknuti kako će se biološki materijal uzet tijekom dijagnostičkih ili drugih terapijskih procedura koristiti kao materijal za istraživanje. Podaci o pacijentu moraju uključivati ime i prezime, datum rođenja, adresu, etničku pripadnost spol, korelaciju genotipa i fenotipa (zahvaćen ili nije zahvaćen s bolesti), neophodne anamnestičke podatke, neophodne rezultate laboratorijskih testova i ostale kliničke podatke. Ukoliko je postavljena dijagnoza bolesti, u bazu se upisuje šifra Međunarodne klasifikacije bolesti (engl. *International Classification of Diseases*-10, ICD-10) i/ili OMIM šifra bolesti

(engl. *Online Mendelian Inheritance in Man,* OMIM*)* te medicinski centar gdje je postavljena dijagnoza. U nedostatku postavljene dijagnoze u dokumentaciju se upisuje sumnja na određenu bolest. Ukoliko je uzorak poslan iz drugog medicinskog centra, osoblje biobanke provjerava stabilnost pakiranja, kvalitetu uzorka, točnost podataka na uzorku i na popratnoj dokumentaciji te druge neophodne formulare (zahtjev, informirani pristanak pacijenta, podaci o uzorku). Nakon što je definirana svrha uzorkovanja (terapija, istraživanje ili oboje) nameće se etičko pitanje koje se tiče dobrovoljnog pristanka tj. je li davanje odgovarajućih informacija o istraživanju bilo dovoljno razumljivo? Ovaj problem postaje još izraženiji u slučaju komercijalnih banki DNA, tkiva i stanica kao npr. banki krvi iz pupkovine. Skladištenje biološkog materijala podiže pitanje kontrole kvalitete i sigurnosti uzorka tijekom dugotrajnog skladištenja. Količina podataka povezanih s biološkim materijalom dovodi do ozbiljnih etičkih pitanja vezanih uz privatnost i mogućnost identificiranja pacijenta pošto neke banke matičnih stanica vežu podatke s biološkim uzorkom putem linka. Osoblje u biobanci mora uključivati standarde da su stalni zaposlenici, voditelj biobanke može biti liječnik ili magistar molekularne biologije i treba biti imenovan od Ministarstva zdravlja. Preporučuje se kontinuirano stručno educiranje svih zaposlenih. Ostalo laboratorijsko osoblje mora biti osposobljeno za rad u biobanci tkiva i stanica. Biobanka mora imati zaposleno i administrativno osoblje koje zapisuje neophodne informacije o uzorku i donoru u posebne baze. Broj zaposlenih osoba je varijabilan, ovisno o veličini biobanke i aktivnosti. Osim neophodnih zahtjeva kao što su informirani pristanak pacijenta i odgovarajući sustav informiranja, dolazi na svjetlo dana pitanje vlasništva nad biološkim materijalima. Treba razmotriti pitanja povezana sa financiranjem biobanki i u slučaju bankrota ili stečaja, spajanja ili podjele banke (bilo da je privatna ili državna banka) tko u biobanci ima pristup uzorcima, pravo na izvoz uzoraka, prodaju i uništavanje bioloških uzoraka; kao i etički i pravni nadzor nad bankom. Uspostava biobanke može biti povezana s nekom grupom bolesti (poput biobanke matičnih stanica povezane sa specifičnom genetskom bolesti) ili populacijom (poput nacionalne banke matičnih stanica).

Kada biobanka provodi medicinska istraživanja potrebno je identificirati podatke što dovodi do etičkih pitanja vezanih za privatnost, povjerljivost i vlasništvo nad uzorcima (Budimir i sur. 2011). Također treba definirati orijentaciju biobanke tj., da li će biobanka biti osnovana u komercijalne (orijentacija na profit) ili znanstvene svrhe (neprofitna organizacija). Registar matičnih stanica pruža određene informacije o svakoj

staničnoj liniji uključujući broj subkulture, obilježje bolesti, etičko odobrenje, informacije o skladištenju i kontakt osobe. Biblioteke ili baze podataka podrazumijevaju prikupljanje detaljnih znanstvenih informacija koje proizlaze iz istraživanja na tim staničnim linijama (Kodeks UK 2010). Podaci se mogu čuvati u papirnatom ili elektroničkom obliku, ali u oba slučaja uzorak treba biti kodiran. U cilju garantirane anonimnosti uzorka, biobanka treba koristiti dvije različite baze podataka. Jednu za podatke povezane s biološkim materijalom kojoj je moguće pristupiti izvana npr. preko interneta i drugu za pohranjivanje osobnih podataka donora koja nikada nije dostupna nikome izvan biobanke. Čak i u papirnatom obliku, dokument koji povezuje donora i uzorak treba biti dostupan samo osoblju biobanke, zaštićen sigurnosnim sistemom. Dokumenti u papirnatom obliku sadrže podatke:

1. dokument - ime i prezime donora, datum kada je uzorak došao u biobanku,
2. dokument - uzorak se može identificirati samo pomoću koda uz koji se vežu ostale relevantne informacije (vrsta uzorka, sumnja na specifičnu bolest, porijeklo uzorka),
3. dokument - s podacima koji su povezani sa uzorkom (povijest bolesti i klinički podaci, informirani pristanak pacijenta, formular za pohranjivanje uzoraka).

Radi povjerljivosti podataka svi dokumenti moraju biti pod ključem, a ključ treba biti pohranjen u dva odvojena kabineta (jedan koji je sadrži dokumente u točkama 1 i 3, drugi u točki 2). Pristup informacijama je zabranjen osim zaposlenicima biobanke.

1. 4. STANDARDI NEOPHODNI ZA UZGOJ HUMANIH STANICA

1.4.1. Dobra laboratorijska praksa

Sva dosadašnja istraživanja s kulturama stanica su pokazala da je većina bioloških uzoraka s kojima se susreće patogene prirode. Odnosno, najveću opasnost za laboratorijske djelatnike predstavlja izloženost infektivnim uzorcima. Kao posljedica toga, izrađene su smjernice koje su s vremenom napredovale u cilju zaštite laboratorijskih djelatnika koji svakodnevno manipuliraju s biološkim uzorcima (npr. koža, mišići i dr.). Ove smjernice su bazirane na pretpostavkama da siguran rad ovisi o politici upravljanja, stručnom znanju i iskustvu, standardnim operativnim postupcima i dosadašnjoj laboratorijskoj praksi. U laboratorije je uveden sustav upravljanja tzv. dobra laboratorijska praksa (engl. *Good Laboratory Practice*, GLP). koji osigurava pouzdanost rezultata. Kategorizirana je razina sigurnosti u laboratoriju kao i potrebna biomedicinska oprema s količinom rizika na način da se povećanjem rizika povećava i razina sigurnosti u laboratorija i zaštita osoblja. Korištenje različitih vrsta zaštitne

opreme koja služi kao primarna zaštita između mikroorganizama i laboratorijskog operativca je ključna za siguran rad. Takva oprema se kreće od korištenja zaštitnih ogrtača, rukavica, maske za lice i druge zaštitne opreme pa sve do laboratorija različitih razina biosigurnosti (www.eurobiobank.org).

1.4.1.1. Laboratorij biosigurnosne razine 1

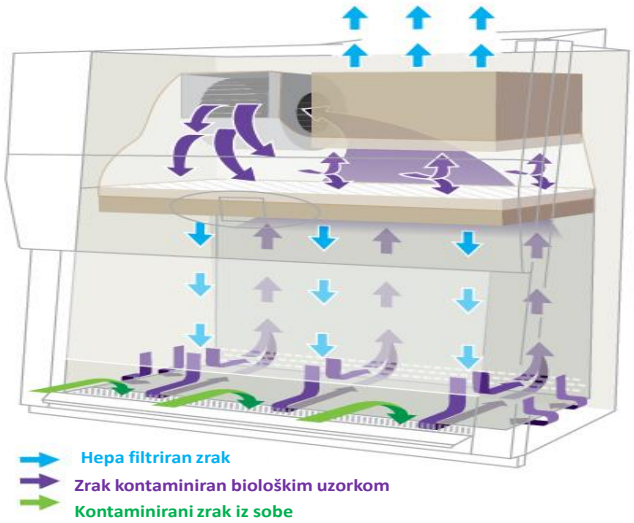
Biosigurnosna razina laboratorija 1 (BSL-1) je prikladna za rad s mikroorganizmima za koje nije poznato da izazivaju bolesti kod zdravih ljudi. Ovaj tip laboratorija se koristi u gradskim/općinskim laboratorijima koji testiraju vodu za piće ili mikrobiološkim laboratorijima na fakultetima gdje se uzorak ne smatra opasnim. Vrata od laboratorija trebaju biti zatvorena radi sprječavanja nepotrebnih ulazaka tijekom procesuiranja uzoraka. Znak upozorenja (biohazard) mora biti postavljen na vrata upozoravajući koja vrsta opasnosti može biti prisutna, uključujući radioaktivni materijal, laser, visoku razinu buke i toksične kemikalije. Umivaonik za pranje ruku bi trebao biti blizu vrata. Otpadni materijal se zbrinjava u skladu s pravilima zaštite okoliša. Također postoji odgovarajuća dekontaminacija infektivnog materijala kao i kemijska dekontaminacija i pravilno zbrinjavanje laboratorijskog posuđa koje je bilo u kontaktu s biološkim materijalom. Radne površine trebaju biti izrađene od materijala koji je otporan na kiseline. Laboratorij bi trebao biti izgrađen na takav način da se može lako dekontaminirati i čistiti. Za BSL-1 ne postoji specifična preporuka za izoliranjem od drugih dijelova zgrade. U BSL-1 standard je korištenje automatskih pipeta i ostale mehaničke opreme za pipetiranje. Zabranjeno je jesti, piti ili pušiti. Neophodno je da svo osoblje pere ruke nakon završetka posla i u slučajevima kada privremeno, samo na kratko izlazi iz laboratorija. Potrebno je nositi zaštitnu odjeću i obuću, a preporučuje se uvijek nositi zaštitne rukavice kada se procesuira biološki uzorak. Dodatna zaštitna oprema uključuje korištenje zaštitnih maski za oči i lice (www.eurobiobank.org).

1.4.1.2. Laboratorij biosigurnosne razine 2

Laboratorij biosigurnosne razine 2 (BSL-2) je tipična biosigurnosna razina za stanične kulture**.** Djelatnicima koji rade u BSL-2 laboratoriju preporučuje se prije započinjanja rada sa staničnim kulturama cijepljenje protiv hepatitisa B. Biološki uzorci s kojima se manipulira u BSL-2 laboratoriju mogu biti infektivni i infekcija se može prenijeti ingestijom, putem sluznice ili kože. Kako se razina biosigurnosti povećava, mikrobiološka praksa i procedure neophodne za nižu razinu se podižu na višu razinu.

Neophodni mikrobiološki standardi zahtjevni su i u razini BSL-2, s naglaskom na korištenje rukavica, mehaničkih pipeta, a potreban je oprez prilikom korištenja igala i drugih oštrih laboratorijskih instrumenata. Zabranjeno je jesti, piti i pušiti u BSL-2 sigurnosnoj razini. Ulazak u laboratorij treba biti strogo kontroliran, ograničen samo određenom broju ljudi i određen od laboratorijskog voditelja koji uspostavlja sigurnosnu razinu, potrebu za specifičnom zaštitnom opremom i neophodnu stručnu edukaciju za rad *in vitro,* odnosno rad sa ljudskim staničnim kulturama. Vrata laboratorija trebaju biti zatvorena da se onemogući ulazak ostalim djelatnicima. Svaki posao koji tijekom manipulacije proizvodi aerosol pridonosi kontaminaciji i treba biti obavljen u odvojenom prostoru, sprječavajući dalje širenje mikroorganizama. U laboratoriju za stanične kulture, najčešće korištena takva oprema je mikrobiološki zaštitni kabinet za sterilan rad klase II. U Europi su poznati kao mikrobiološki zaštitni kabineti engl. *Microbiological Safety Cabinet* - MSC ili u SAD poznati kao engl. *Biological Safety Cabinet* - BSC. Brzina protoka zraka u kabinetu kreće se od 0,25-0,45 m/s uz mogućnost podešavanja. Osnovna uloga je zaštita djelatnika, predmeta rada i okoline. Pravilan rad u kabinetu podrazumijeva da visina prednjeg stakla mora biti od 160 mm do 250 mm od radne površine, a ruke moraju biti skroz unutar kabineta i bez naglih pokreta. Ukoliko zrak ne cirkulira dobro ili prednje staklo nije podešeno na optimalnu razinu te je ugrožena sigurnost rada, javlja se alarm koji upozorava operatera. Stanični i molekularni biolog mora znati adekvatno koristiti kabinet i razumjeti način cirkuliranja zraka, odnosno pričekati 10-ak minuta od kada se uključi kabinet da bi se postigla brzina protoka i čistoća zraka. Zrak iz sobe se uvlači u otvoreni prostor kabineta, odmah povlači dolje kroz prednje rešetkaste otvore i prolazi ispod radne površine, dakle ne kontaminira radnu površinu. Nakon toga zrak je ispuhan iza i dolazi do vrha kabineta gdje se dijeli. Oko 30% zraka izlazi van iz kabineta kroz visoko efikasni filter (engl. *High efficiency particulate air* - HEPA) i vraća nazad u sobu. Ostatak od 70% zraka se vraća dolje u mikrobiološki kabinet kroz drugi HEPA filter i prelazi preko radne površine i odlazi kroz prednje i zadnje rešetke (Slika 7). Klasični HEPA filteri otklanjanju 99,97% svih čestica koje su 0.3 mikrometara veličine ili veće, što podrazumijeva da su svi mikroorganizmi zadržani u filteru (klasa A). Dakle, zrak koji se vraća u laboratorij i dio koji je dostavljen do radne površine smatra se posve sterilnim. Dobra laboratorijska praksa podrazumijeva obavezno bilježenje u dnevnik rada svega što je učinjeno sa staničnim kulturama. Nakon rada s infektivnim materijalom u kabinetu

obavezno je dekontaminirati radne površine. Ukoliko je došlo do slučajnog prolijevanja medija i drugih reagencija ili neke druge incidentne situacije neophodno je poduzeti dodatno čišćenje i dezinficiranje. Prije nego što unesemo materijal, kabinet mora biti obrisan sa 70% alkoholom radi dezinfekcije. GLP podrazumijeva dobro kontroliranje rada u mikrobiološkom kabinetu jer su sterilni uvjeti neophodni da bi se prevenirala kontaminacija. Brzi protok zraka u blizini otvora kabineta (npr. bilo da brzo prođe drugi djelatnik ili bilo koji drugi način direktnog ulaska zraka kroz zračnu barijeru) može prekinuti zračnu zavjesu kroz rešetke kabineta, rezultirajući direktnim ulaskom nesterilnog zraka unutar kabineta i ugrožavajući sigurnost biološkog uzorka.



Slika 7. Protok i recikliranje zraka u mikrobiološkom kabinetu

Biološki uzorci koji se moraju procesuirati u laboratoriju sigurnosne razine 2 ili višem:

- stanične kulture (primarne i sekundarne) životinjskog porijekla,
- stanične kulture (primarne i sekundarne) ljudskog porijekla,
- stanične kulture porijeklom od limfnog ili tumorskog tkiva,
- stanične kulture izložene ili transformirane s onkogenim virusom,
- stanične kulture zaražene mikoplazmom,
- humani biološki materijali (humana tkiva i tjelesne tekućine dobivene kirurški ili autopsijom).

Tekući dušik je na sobnoj temperaturi bezbojna tekućina bez okusa i mirisa te nije zapaljiv. U tekućem obliku (temperatura -196 °C) prikladan je za krioprezervaciju i dugotrajnu pohranu bioloških uzoraka. Pohranjuje se u spremnike za kriogene tekućine. Tri su glavna rizika povezana s tekućim dušikom: smrzotine, gušenje i eksplozije epruveta. Tekući dušik u kontaktu s kožom uzrokuje smrzotine ili hladne opekline. Koža se može prilijepiti za sigurnosnu metalnu šipku, što može prouzročiti oštećenje tkiva. Plinovi koji isparavaju iz spremnika s tekućim dušikom također su hladni i mogu

uzrokovati hladne opekline. Pri isparavanju javlja se magla zbog kondenzacije vlage iz zraka. Djelatnici koji pohranjuju bioptate u tekući dušik moraju prethodno biti upoznati s pravilnim načinom zamrzavanja i opasnostima koje može uzrokovati zaostali tekući dušik u epruvetama. Pohranjivanje i odmrzavanje biološkog materijala iz tekućeg dušika zahtjeva odgovarajuću osobnu zaštitnu opremu. Neophodno je nositi rukavice dovoljno debele radi izolacije, ali i dovoljno fleksibilne da omogućuju rukovanje epruvetama. Prilikom uzimanja uzoraka iz spremnika s tekućim dušikom treba unaprijed pripremiti kutijicu s ledom i uzorak iz tekućeg dušika staviti u led (-20 °C) da bi se spriječila eksplozija epruveta s bioptatom uslijed razlike tlakova i temperatura. Visoke koncentracije dušika u plinovitom stanju, bez upozoravajućih simptoma, mogu uzrokovati gušenje posebno ako dušik isparava u zatvorenom prostoru. Dušik udahnut pod visokim tlakom može djelovati narkotički. Simptomi mogu uključivati mučninu, gubitak pokretljivosti ili svijesti. Ako u toj atmosferi djelatnik ostane dugo rezultati mogu biti fatalni (www.eurobiobank.org).

1.4.1.3. Biosigurnosna razina laboratorija 3

Biosigurnosna razina laboratorija 3 (BSL-3) je prikladna za rad s infektivnim materijalom koji može uzrokovati opasne ili potencijalno smrtonosne bolesti kao rezultat izlaganja inhaliranjem. BSL-3 laboratoriji bi trebali biti locirani odvojeno od jako prometne zone. Općenito se podrazumijeva da budu i u odvojenim sigurnosnim zgradama. BSL-3 laboratorij ima ulaz s duplim vratima jer uzorci s kojima se manipulira mogu biti zarazni i mogu se prenositi putem aerosoli. Svi otvori u zidovima, stropu, i podu su brtvljeni na način da zadržavaju aerosolne i plinske dekontaminante. Pod u laboratoriju je monolitan i ima podnu lajsnu koja se podiže najmanje 10 cm uza zidove. Strop treba biti vodonepropustan i pogodan za lako čišćenje. Centrifugalne epruvete su postavljene u sterilne posude unutar BSC, prenesene u centrifugu, centrifugirane i zatim vraćene u BSC za pražnjenje. Nekada klasa II tip B3 kabineti zahtijevaju posebnu vezu sa sustavom odvodnje zraka. Ovisno o vrsti laboratorija, dodatna zaštitna oprema može biti korištena, npr. respiratori. Voditelji BSL-3 laboratorija trebaju biti kompetentni stručnjaci s iskustvom u radu s infektivnim materijalom. Oni uspostavljaju kriterije za ulazak u laboratorij, ograničavaju pristup, razvijaju odgovarajuće prakse i procedure, izrađuju SOP-ove i obučavaju osoblje. Oni su također odgovorni za izradu priručnika o sigurnosti u laboratoriju. Laboratorijsko osoblje mora strogo poštivati postavljene

smjernice, sudjelovati u posebnim nadzornim programima i prijavljivati sve incidente koji mogu dovesti do potencijalne opasnosti (www.eurobiobank.org).

1.4.2. Dobra proizvođačka praksa

Smjernice dobre proizvođačke prakse (engl. *Good Manufacturing Practices*, GMP) postavljaju kvalitativne standarde za izradu medicinskih proizvoda. Smjernice GMP pokrivaju kvalitativne i sigurnosne standarde u svim aspektima proizvodnog procesa, od medicinskih objekata, laboratorijske opreme i obučenosti stručnog osoblja, do polaznih supstanci, standardnih operativnih procesa i sustava upravljanja kvalitetom u medicinskim laboratorijima. Smjernice GMP su više od 50 godina u uporabi u farmaceutskim tvrtkama i kod proizvođača medicinskih proizvoda. Razvoj regenerativne medicine postavlja nova pitanja vezana za održavanje i unaprjeđenje kvalitete u kliničkoj praksi. Terapije u regenerativnoj medicini koriste medicinske tehnike kao što je tkivno inženjerstvo koje uključuje nove vrste medicinskih proizvoda koji mogu biti laboratorijski kultivirane ili genetički modificirane stanice. Terapija i dijagnostika u regenerativnoj medicini koja uključuje primjenu ljudskih živih stanica ne može biti standardizirana na isti način kao proizvodnja komercijalnih lijekova u farmaceutskoj industriji, tako da su potrebni drugačiji sigurnosni i kvalitativni standardi. Primjena HRN ISO 15189 standarda za medicinske laboratorije i dokumentirano praćenje sustava kontrole kvalitete mora biti neprestano primjenjivano od strane laboratorijskog osoblja. Slični kvalitativni standardi primjenjuju se na sve ulazne sastojke u radu sa sterilnim kulturama (npr. stanice i kultivacijski medij), opremu (inkubator, mikroskopi, mikrobiološki kabinet), procese (izolacija primarnih i sekundarnih kultura stanica i dugotrajno zaleđivanje), pa sve do najsitnijeg dijela laboratorijske opreme. Dostizanje, nadzor i praćenje ovih važnih standarda složen je i financijski zahtjevan proces.

Različita regulatorna tijela u svijetu donose smjernice GMP tako npr. Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicine Agency*, EMA) donosi smjernice u Europi dok Administracija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) pokriva to područje u SAD-u. Mnoge druge zemlje koriste GMP smjernice donesene od Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO). Sve ove agencije imaju za cilj da samo sigurni proizvodi dođu do tržišta. Smjernice se moraju redovno razmatrati i dopunjavati kako bi zadržale korak sa znanstvenim dostignućima i promjenama u društvu (www.eurostemcell.org).

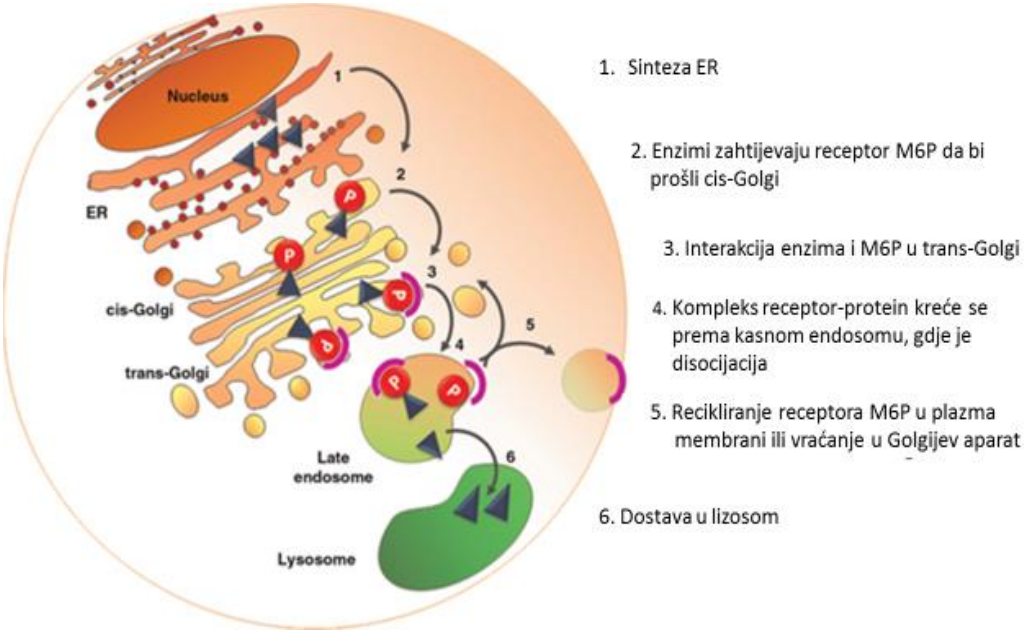
1. 5. RIJETKE BOLESTI

Rijetke bolesti su klinički heterogena skupina bolesti u pogledu etiologije, tijeka bolesti i zahvaćenosti organskih sustava s pojavnošću manjom od 5 na 10 000 osoba tj. 1:2000. Danas je poznato preko 7000 rijetkih bolesti i svaka rijetka bolest pojedinačno ima nisku pojavnost. Drugim riječima od 27 do 36 milijuna osoba u Europi boluje od neke rijetke bolesti (Nacionalni plan i program za rijetke bolesti 2015-2020. godine). Bolesti su multisistemske i nemaju glavnog simptoma te je zbog toga neophodna interdisciplinarna suradnja u dijagnozi i liječenju. Europska organizacija za rijetke bolesti, EURORDIS navodi da 80% rijetkih bolesti ima genetsko porijeklo (www.eurordis.org). Zovu se još bolesti Orphan (engl. *Orphan*-siroče) jer nedostaje ekonomski interes velikih farmaceutskih tvrtki za investiranjem novih lijekova za njih. Rijetke bolesti se kasno otkrivaju, a kasna dijagnoza može dovesti do teških i nepopravljivih posljedica što otežava liječenje. Životni vijek kod takvih bolesnika je često smanjen. Ipak, ako se otkriju na vrijeme, mnoge od ovih bolesti moguće je uspješno liječiti. Dob u kojoj se javljaju je različita, ali kod većine su prvi simptomi prisutni već u ranom djetinjstvu. Procjenjuje se da u Hrvatskoj ima oko 250 000 oboljelih od rijetkih bolesti ali kako točni podaci ne postoje i mnoge od tih bolesti nisu dijagnosticirane, realno se očekuje mnogo veći broj **(**Nacionalni plan i program za rijetke bolesti 2015-2020. godine). Simptomi bolesti su neuobičajene promjene lica, povećan jezik, ljubičasto-plavi osip po koži, povećani izbočeni trbuh, zaostajanje u rastu, deformacija skeleta, mišićna slabost i drugo. Nasljedne metaboličke bolesti se dijele na lizosomske bolesti nakupljanja kao što su mukopolisaharidoze, sfingolipidoze, na poremećaje u transportu manjih molekula i ostale metaboličke poremećaje čiji su simptomi uzrokovani nedostatkom proizvodnje energije, primjerice glikogenoze ili poremećaji mitohondrijskog stvaranja energije (Fumić i sur. 2004). U ovom radu su obrađene najčešće podskupine lizosomskih bolesti nakupljanja i poremećaji mitohondrijskog stvaranja energije tzv. mitohondriopatije.

1.5.1. Lizosomske bolesti nakupljanja

Lizosomi su stanične organele okružene membranom koji sadrže oko 50 različitih hidrolitičkih enzima, a služe za razgradnju proteina, DNA, RNA, polisaharida i lipida (Filocamo i Morrone 2011). Jedna od glavnih uloga lizosoma je probava unesenog materijala endocitozom. Lizosomi nastaju stapanjem transportnih vezikula koje pupaju

iz trans-mreže i spajaju se sa kasnim endosomima. Razlikujemo tri tipa endosoma. Rani endosomi se nalaze blizu stanične membrane i oni primaju sadržaj kojeg razvrstavaju. Tvari koje se trebaju vratiti u staničnu membranu se pomoću reciklažnih endosoma šalju nazad u membranu npr. membranski receptori, a oni koji su namijenjeni za razgradnju se šalju kasnim endosomima i djelovanju lizosomskih enzimima. Dozrijevanje ranih endosoma u kasne endosome obilježeno je snižavanjem pH do 5,5. Većina lizosomskih enzima su kisele hidrolaze, koje su jedino aktivne u takvom kiselom pH području. Lizosomski enzimi se sintetiziraju u hrapavom endoplazmatskom retikulu (ER), kreću se kroz membranu u lumen ER preko N-terminalne signalne sekvence. Kada dospiju u lumen ER, glikoziliraju se, a signalna sekvenca se pocijepa. Nakon ER odlazi u Golgijev odjeljak. U ovoj fazi lizosomski enzimi trebaju receptor manoza 6 fosfat (engl. *Mannose 6-phosphate*, M6P) da bi ušli u lizosom (Hickman i Neufeld 1972). Nastali kompleks receptora i proteina odlazi u kasni endosom gdje se događa disocijacija, hidrolaza se translocira u lizosom, a receptor M6P se reciklira u Golgijevom aparatu do plazma membrane (Slika 8).



Slika 8. Lizosom
Preuzeto i prilagođeno iz Filocamo i Morrone 2011

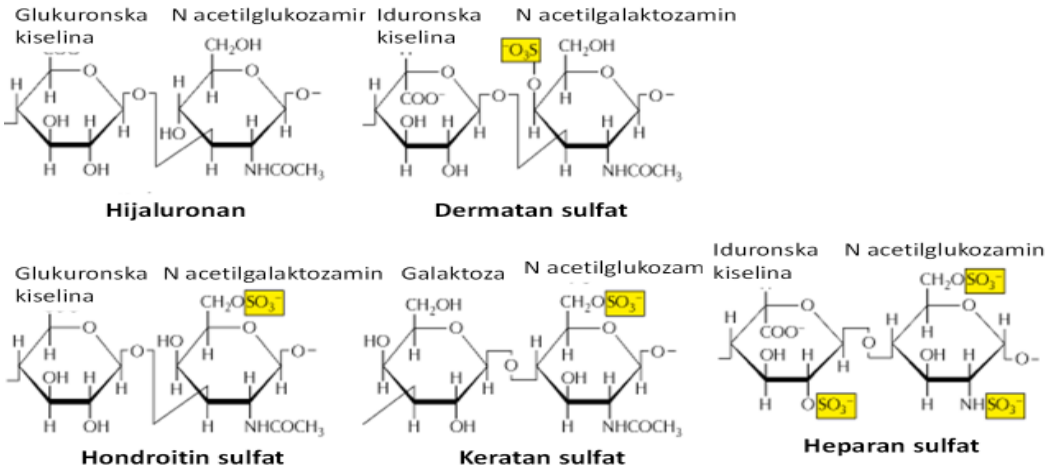
Konačni korak u sazrijevanju lizosomskih enzima podrazumijeva proteolizu, pravilno smatanje proteina i agregaciju (Filocamo i Morrone 2011). Mutacijom gena koji kodiraju ove hidrolitičke enzime kao što su glikozidaze, sulfataze, proteaze i esteraze nastaju lizosomske bolesti nakupljanja. Ove bolesti nastaju uslijed snižene

aktivnosti nekog od tih enzima te dolazi do nakupljanja nerazgrađenog supstrata u organelima, što za posljedicu ima oštećenje stanice i okolnog tkiva. Međutim, 1968. godine postignut je napredak u laboratorijskoj dijagnostici nasljednih bolesti nakupljanja jer su se počele koristiti stanične kulture kožnih fibroblasta kod bolesnika sa mukopolisaharidozom tip I i tip II (Fratantoni i Hall 1968). Poznato je oko 50 lizosomskih bolesti nakupljanja čija se učestalost procjenjuje od 1:5 000 do 1:8 000 živorođene djece (Meikle i sur. 1999).

Bolest karakterizira progresivan klinički tijek dok se brzina progresije razlikuje ovisno o lizozomskoj bolesti. Klinički simptomi obuhvaćaju hepatosplenomegaliju, poremećaj u rastu i razvoju kostiju, facijalnu dismorfiju, respiratorne i srčane probleme i dr. Kao posljedica nakupljanja nerazgrađenog supstrata u lizosomima živčanih stanica prisutne su različite neurološke smetnje. Klinička slika je heterogena i može se pojaviti tijekom cijelog života, a unutar jedne od lizosomskih bolesti nakupljanja može varirati od sasvim blagih do teških oblika. Dijele se na osnovu nakupljenog supstrata u lizosomima na: mukopolisaharidoze, sfingolipidoze, lipidoze, oligosaharidoze, mukolipidoze, glikogenoze, neuronalne ceroidne lipofuscinoze i poremećaje prijenosa (Fumić i sur. 2004).

1.5.1.1. Mukopolisaharidoze

U prvu podskupinu lizosomskih bolesti nakupljanja spadaju mukopolisaharidoze (MPS) koje obuhvaćaju sedam tipova bolesti sa progresivnim tijekom bolesti te zahvaćaju više organa. MPS nastaje zbog manjka aktivnosti jedne od 11 poznatih lizosomskih hidrolaza neophodnih za razgradnju glikozaminoglikana (GAG). Glikozaminoglikani su polisaharidi koji se sastoje od lančano povezanih disaharidnih jedinica u kojima je uvijek nazočan glukozamin ili galaktozamin (Slika 9). Drugi monosaharid je jedna od uronskih kiselina, L-glukuronska ili L-iduronska kiselina. Nesulfatirani je hijaluronan a hipersulfatirani je heparan sulfat. Prema vezama između šećera, broju i lokaciji sulfatnih grupa dijele se na hijaluronan, hondroitin sulfat, dermantan sulfat, heparan sulfat i keratan sulfat (Tablica 1). Glikozaminoglikani se velikim dijelom nalaze u vezivnom tkivu, te su patološke promjene najviše povezane s kostima, zglobovima, srčanim zaliscima, jetrom kao i drugim organima bogatim vezivom.



Slika 9. Glikozaminoglikani

Prilikom nakupljanja glikozaminoglikana u lizosomima stanica živčanog sustava nastaju neurološke smetnje i mentalna zaostalost. Prosječna učestalost svih MPS procjenjuje se na 1 od 22 000 živorođene djece. Bolest se očituje krajem prve godine života, a tijekom druge i treće godine bolest postaje potpuno prepoznatljiva. Većina ima grube crte lica, mentalnu retardaciju, poremećaj u rastu i razvoju, zamućenje rožnice, hepatomegaliju a ponekada splenomegaliju. Mukopolisaharidoze se nasljeđuju autosomno recesivnim putem, osim mukopolisaharidoze II, čije je nasljeđivanje vezano uz X kromosom. Mukopolisaharidoze se utvrđuju prisutnošću vakuola u citoplazmi leukocita koje potječu od istaloženih mukopolisaharida (Fumić i sur. 2004).

Ključan korak u dijagnostici je pojačano izlučivanje mukopolisaharida u urinu. Analiziraju se kromatografskim tehnikama razdvajanja glikozaminoglikana na pojedine frakcije. Dijagnoza se postavlja određivanjem aktivnosti enzima iz homogenata leukocita. U velikom broju nasljednih metaboličkih bolesti, stanična kultura fibroblasta predstavlja nezaobilazan biološki materijal na putu prema dijagnozi. Za mukoplisaharidoze tipa I je dostupno enzimsko nadomjesno liječenje primjenom humane rekombinantne alfa-L-iduronidaze. Ovaj enzim uspješno odstranjuje glikozaminoglikane iz lizosoma, što se uočava poboljšanjem pokretljivosti zglobova, oštrine vida i funkcionalnog srčanog statusa. Moguće je liječiti bolesnike koji boluju od nekih oblika MPS i transplantacijom koštane srži (Petković i Barić 2005).

Tablica 1. Klasifikacija mukopolisaharidoza

MPS	Naziv MPS	Enzim koji nedostaje	GAG
I	Hurler, Hurler-Scheie ili Scheie	α-iduronidaza	Dermatansulfat Heparansulfat
II	Hunter	iduronat -2-sulfataza	Dermatansulfat Heparansulfat
III A	Sanfilippo A	heparan N-sulfataza	Heparansulfat
III B	Sanfilippo B	α-N-acetilglukozaminidaza	Heparansulfat
III C	Sanfilippo C	AcCoA; α-glukozaminid acetiltransferaza	Heparansulfat
III D	Sanfilippo D	Glukozamin- 6-sulfataza	Heparansulfat
IV A	Morquio A	Galaktozamin-6-sulfataza	Keratansulfat Hondroitinsulfat
IV B	Morquio B	β-galaktozidaza	Keratansulfat
VI	Maroteaux-Lamy	N-acetilgalaktozamin-4-sulfataza	Dermatansulfat
VII	Sly	β-glukuronidaza	Dermatansulfat Heparansulfat Hondroitinsulfat

1.5.1.2. Sfingolipidoze

Najčešće zastupljena sfingolipidoza je Gaucherova bolest koja je autosomno recesivna lizosomska bolest (Tablica 2). Bolest karakterizira nedostatak enzima glukocerebrozidaze. Zbog nedostatka enzima dolazi do nakupljanja glukozilceramida u lizosomima te postupno do propadanja stanica. Prevalencija je oko 1:60 000, a klinička slika varira od asimptomatskih do smrtonosnih oblika (Merkler i sur. 2014).

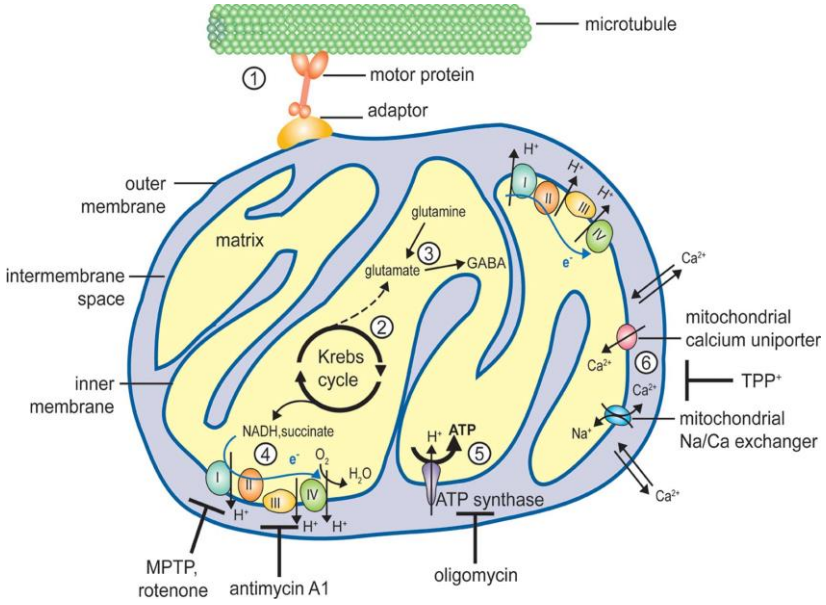
Tablica 2. Klasifikacija sfingolipidoza

Lizosomska bolest	Naziv sfingolipidoze	Enzim koji nedostaje	Nataložena tvar
Cerebrozidaza	Gaucherova bolest tip I, II i III	Glukocerebrozidaza	Glukozilceramid
Cerebrozidaza	Krabbeova bolest	Galkozilceramidaza	Galaktoceramid
Neimann-Pickova bolest	tip A i B	Kisela sfingomijelinaza	Sfingomijelin
Neimann-Pickova bolest	tip C	Poremećaj esterifikacije egzogenog kolesterola	Neesterificirani kolesterol
Gangliozidoze	MG1	β- galaktozidaza	GM1 gangliozidi

Gangliozidoze	MG2 Tay-Sachs	β-heksozaminidaza A	GM2 gangliozidi
Gangliozidoze	MG2 Sandhoff	β-heksozaminidaza A i B	GM2 gangliozidi
Ceramidoza	Farberova bolest	Kisela ceramidaza	

1.5.2. Mitohondrijski poremećaji stvaranja energije

Mitohondrijski poremećaji stvaranja energije tzv. mitohondriopatije su poremećaji s različitom kliničkom slikom. Pacijenti pokazuju različite oblike disfunkcije neuromuskularnih i drugih organskih sustava. Tkiva koja zahtijevaju puno energije, kao što su mozak, retina, srce, jetra i skeletni mišići su najčešće zahvaćeni. Mitohondrij je stanična organela koja se sastoji od dvije membrane, unutrašnje i vanjske. Vanjska membrana je relativno napeta, a unutrašnja membrana sadrži enzime i proteine. Organela generira energiju u stanici u obliku ATP te se koristi kao izvor kemijske energije.



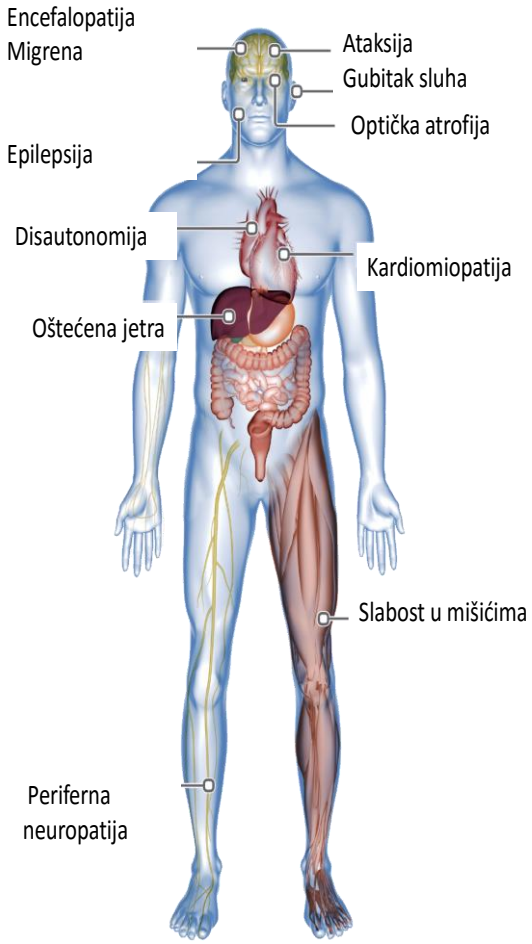
Slika 10. Mitohondrij preuzeto iz Vos i sur. 2010.

Mitohondriji su organele u kojima se obavlja ciklus limunske kiseline (Krebsov ciklus), a uključeni su i u druge stanične aktivnosti poput signalizacije, stanične diferencijacije, staničnog starenja u kontroli staničnog ciklusa, rastu i starenju stanica (Slika 10). Organelu je prvi opisao Altmann 1890. godine i nazvao je bioblast, nakon njega Benda je 1897. godine organelu nazvao mitohondrij (O'Rourke 2010). Mitohondrij je dinamična organela koju motorni proteini kinezini i dineini nose po

mikrotubilima u oba pravca. Mitohondriji mogu prijeći kratke udaljenosti krećući se po aktinskim filamentima pomoću miozinskih motora. Metabolički poremećaj kod kojeg stradavaju mišići uslijed nedostatka S-adenozil-homocistein hidrolaze (SAHH) prvi je opisao I. Barić (Barić i sur. 2005; Barić i sur. 2012). Poremećaj karakterizira mišićna slabost i visoka koncetracija kreatinin kinaze. Nasljeđuje se autosomno recesivno. Način stradavanja mišića je zasad nepoznat. Smatra se da je ova bolest jedna od češćih prirođenih miopatija.

Biokemijska, histokemijska i molekularna analiza mišićnog tkiva je neophodna za uspostavljanje dijagnoze povezane sa mitohondrijskim bolestima. U situacijama kada je jasan mitohondrijski sindrom i bolest je povezana preko majčine strane s poznatom mutacijom mtDNA sekvenciraju mutirani geni (Magri i sur. 2011). Kod odraslih osoba uzima se biopsija kvadricepsa s iglom. Nedostatak ove metode je taj što je proces jako bolan. Kod djece se pod općom anastezijom uzima biopsija mišića. Ponekada se biopsija mišića može uzeti pod lokalnom anestezijom iz *musculus tibialis anterior*. Biokemijske analize mogu se napraviti iz svježeg ili zamrznutog bioptata. Preporučuje se raditi biopsiju u specijaliziranim centrima iz logističkih ili metodoloških razloga (Koene i Smeitinik 2011). Bilo kakvo odstupanje od protokola zahtijeva uzimanje nove biopsije. Atrofija miofibrila, akumulacija sakoplazmatskih lipida i glikogena, ili disproporcija fibrinskih niti može biti prisutna kod pacijenata s mitohondrijskim bolestima. Elektronska mikroskopija se koristi za analiziranje mitohondrijskih struktura u mnogo detaljnijem obliku, uključujući mitohondrijsku lokaciju i morfologiju. Kod djece zahvaćene s miopatijama, histologija i histokemija mišića je obično normalna dok elektronski mikroskop pokazuje nepravilnosti u broju i strukturi mitohondrija. Mitohondrijsko stvaranje energije može se mjeriti u svim tkivima, ali uglavnom se koriste skeletni mišići za dijagnostiku jer su bogati mitohondrijima. Kultura fibroblasta pacijenata sa miopatijama se također rutinski koristi za dijagnostiku. Mitohondrij je prisutan u svim stanicama i sumnje na mitohondrijske poremećaje uključuje različite organe. Kardiomiopatija je čest simptom povezan s mitohondrijskim bolestima. Laboratorijski nalazi koji upućuju na ove bolesti su povišenje laktata u krvi, povećana koncentracija aminokiseline alanina u krvi, kod organskih kiselina laktat i piruvat. Visoka koncentracija kreatinin kinaze (CK) je primjećena kod mitohondrijskih bolesti. Analiza organskih kiselina u urinu može pokazati specifičan trag npr. visoku koncentraciju trikarboksilne kiseline (Krebsov ciklus fumarna ili alfa keto glutarična kiselina). Novi biomarker koji treba istražiti prije korištenja u rutinskoj uporabi u

dijagnostici je faktor rasta fibroblasta 21 (engl. *Fibroblast Growth Factor 21*, FGF-21). Zadnji korak u dijagnostici miopatija podrazumijeva biopsiju skeletnog mišića za histološku i biokemijsku analizu. Mitohondrijski poremećaji su visoko suspektni kod pacijenata kod kojih su uključena 3 organska sustava, bolesti povezane s nasljeđem po majčinoj liniji, dok su najčešći simptomi slabost u mišićima, kardiomiopatija, otkazivanje jetre i drugo (Slika 11).



Slika 11. Najčešći simptomi povezani s mitohondriopatijama
preuzeto i prilagođeno prema Koene i Smeitinik 2011.

Dijagnoza se potvrđuje analizom gena. Poremećaji mitohondrijskog stvaranja energije su uzrokovani mutacijom mitohondrijske DNA u manje od 10 % a u većini slučajeva mutacijima nuklearne DNA (Barić 2012).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj istraživanja je optimizacija uspostave primarnih i sekundarnih kultura humanih fibroblasta i skeletnih mioblasta izoliranih od pacijenata s rijetkim bolestima te harmonizirati SOP-ove prikupljanja, procesuiranja, skladištenja i raspodjele uzoraka i podataka za dijagnostiku i istraživanje u skladu sa EU Direktivama i standardima GLP/GMP, EBB i ISO 15 189.

U tu svrhu potrebno je:

1. Napisati radne upute vezane uz rad na kulturama od prikupljanja, procesuiranja, skladištenja i raspodjele uzoraka u skladu s EBB i ISO 15 189.

2. Unaprijediti klasifikaciju registra baze podataka u biobanci kroz unaprjeđenje klasifikacije i šifriranje rijetkih bolesti usklađivanjem s jednom od internacionalnih smjernica:
   ICD-10 (engl. *International Classification of Diseases-10*) s odgovarajućim kodovima ili OMIM (engl. *Online Mendelian Inheritance in Man)* klasifikacija s odgovarajućim kodovima (Prilog 1. Metaboličke bolesti i međunarodna klasifikacija ICD-10).

3. Upisati anatomsko porijeklo biološkog uzorka i broj pasaže staničnih kultura.

4. Stvoriti sve preduvjete za osnivanje biobanke tkiva i stanica za rijetke bolesti.

5. Upisati ukupan broj uzgojenih i uskladištenih kultura kao i broj bioptata.

6. Analizirati ukupan broj dijagnosticiranih pacijenata s lizozomskih bolestima nakupljanja

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

U razdoblju od 1995. do 2015. godine prikupljali su se biološki uzorci od pacijenata kod kojih postoji sumnja na nasljednu metaboličku bolest. Uzorci kože, skeletnih mišića i ostali bioptati prikupljeni su u skladu s hrvatskim zakonima i europskim direktivama izdanim od Europske komisije za biobanking i preporukama Svjetske liječničke organizacije (Gottweis i sur. 2012; WMA 2002). U istraživanju su izolirani: kožni fibroblasti, skeletni mioblasti i različiti humani bioptati (mišići, jetra).

Biološki uzorci sakupljeni su u najvećem broju od pedijatrijskih pacijenata sa Zavoda za bolesti metabolizma, Kliničkog bolničkog centra Zagreb kao i iz drugih kliničkih centara iz cijele Hrvatske (Prilog 2. Primjer informiranog pristanka pacijenta za biopsiju mišića na KBC Zagreb)

3. 2. MATERIJALI

3.2.1. Pribor

Plastični pribor koji se koristi mora biti za jednokratnu uporabu, odgovarajuće obilježen. Na pakiranju treba biti jasno naznačen broj uzoraka, vrsta materijala, sterilnost, kataloški broj, lot, rok trajanja te namjena za adherentne stanične kulture. U pribor spadaju:

- epruvete za centrifugiranje od 15-50 mL (Greiner bio-one, Austrija)
- filteri 0.22 μm (Millipore) s plastičnom bocom 500 mL (TPP, Austrija)
- pipete 5-10 mL i Petrijeve zdjelice 60 mm (TPP, Austrija)
- kultivacijske zdjelice od 25-75 cm^2 bez filtera (Greiner bio-one, Austrija)
- kultivacijske zdjelice 25-75 cm^2 s filterom (Greiner bio-one, Austrija)
- epruvete 1.8 - 2.0 mL (Cryo.s^{TM,} Greiner bio-one, Austrija)
- plastične šprice 5-10 mL
- stakleni štapići dužine 1 - 2 cm, promjera 3 - 5 mm, s ugrađenim željeznim štapićem
- sterilno stakleno posuđe: Erlenmeyerova tikvica, boce s čepom, staklene čaše
- hemocitometar
- sterilni kirurški instrumenti za mikrodisekciju: (pincete, skalpeli, škare, igle)
- 70% etanol u destiliranoj vodi, ili drugi prikladni dezinficijens (npr. Incidin)

3.2.2. Oprema

- Mikrobiološki zaštitni kabinet klase II (S@FEMATE 1.2, Italija)
- CO_2 inkubator (Kambič, Slovenija)
- Invertni mikroskop (Olympus IX 50, Hamburg, Njemačka)
- Hladnjak s ledenicom (Zanussi, Italija)
- Ledenica od -70 do - 90 °C (Thermo Scientific)
- Centrifuga s hlađenjem (Eppendorf 5810R, Hamburg, Njemačka)
- Vodena kupelj od 37 do 56 °C
- Spremnik tekućeg dušika (MVE XC47/11-6)
- Magnetski MiniMACS separator (Miltenyi Biotec, Njemačka)
- Pipetori (Hirschmann, Eberstadt, Njemačka)
- Automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

3.2.3. Popis otopina potrebnih za stanične kulture

- SGM medij, (500 mL) engl. *Skeletal Muscle Cell Growth Medium*, PromoCell
- DMEM medij, (500 mL) engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium,* Gibco s visokom dozom glukoze 4500 mg/L (+4 ºC)
- FBS fetusni goveđi serum, (500 mL) engl. *Fetal Bovin Serum*, Sigma (-20 ºC)
- L-Glutamin x 200 mM, (100 mL) EuroClone (-20 ºC)
- Antibiotik, (100 mL) engl. *Antibiotic/Antymicotic solution*, Sigma (-20 ºC)
- DPBS-CMF, (500 mL) Dulbekov fosfatni pufer bez Ca^{+2} i Mg^{+2} (engl. *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline Calcium and Magnesium Free*, EuroClone) (18-25 °C)
- Tripsin/EDTA (0,25% Tripsin/1mM EDTA, Life Technologies) (-20 ºC)
- DMSO Dimetilsulfoksid (5 x 5 mL) (18-25 °C)

3.3. METODE

3.3.1. Zajednički sigurnosni aspekti rada s humanim kulturama stanica

Da bi se uzgojile humane stanične kulture *in vitro* moraju se poštivati i provoditi standardni operativni postupci koji onemogućuju onečišćenje bakterijama, gljivicama i mikoplazmama kao i unakrsne kontaminacije s drugim staničnim linijama.

Važno je provoditi sljedeće postupke:

- kod procesuiranja bioptata nositi jednokratni ogrtač, masku za lice i rukavice,
- preko noći u laboratoriju uključiti UV lampu,
- sve radne površine u laboratoriju za stanične kulture držati suhim i čistim,

- prije početka rada u kabinetu upaliti UV lampu na 30 minuta,
- prije rada uključiti mikrobiološki kabinet II (S@femate 1,2 Italija) s laminarnim protokom zraka (engl. *Laminar flow*) na 20-ak minuta,
- dezinficirati rukavice sa 70% etanolom i osušiti ih na zraku,
- dezinficirati sve reagense, potrošni materijal i sitnu opremu prije stavljanja u kabinet,
- medije zagrijati do 37 °C ili minimalno na sobnu temperaturu,
- sve medije i reagencije otvarati samo u unutrašnjosti kabineta,
- prije zatvaranja boce s medijem, čepom i vratom boce lagano se prođe preko plamenika,
- da bi se izbjegla kontaminacija s drugim staničnim kulturama manipulirati stanične linije samo od jednog pacijenta unutar kabineta,
- mijenjati uvijek nove pipete za svaku novu staničnu liniju,
- stanične kulture i medije kontrolirati dnevno radi provjere kontaminacije s bakterijama i gljivicama,
- nakon završenog posla, čep od medija zaštiti parafilmom a ostalu opremu treba dezinficirati prije vraćanja na svoje mjesto,
- radna površina unutar kabineta mora biti očišćena 70 % etanolom i incidinom,
- rukavice i ostali potrošni materijal zbrinuti u infektivni otpad,
- inkubator, kabinet centrifugu i mikroskop redovito održavati i čistiti.

3.3.2. Izolacija fibroblasta

U originalnu bocu DMEM-a 500 mL dodaje se pažljivo jedna po jedna komponenta 20% FBS, 1% L glutamin, 1% antibiotik. Nakon dodavanja svih komponenti medij se filtrira kroz filter 0,22 μm i ostane u sterilnoj boci koja se nalazi ispod HEPA filtera i pravilno obilježi. Medij se čuva na +4 ^{o}C do mjesec dana, a može se koristiti kao transportni medij. Priprema medija za rast humanih fibroblasta prikazana je sažeto u Tablici 3.

Tablica 3. Medij za rast fibroblasta u kulturi

Reagens	Kataloški broj	Proizvođač	Količina u %
DMEM	41966	Gibco	78 %
FBS	F9665	Sigma	20 %
Antibiotik/antimikotik 100x	A5995	Sigma	1 %
L- glutamin 100x	ECB300	EuroClone	1 %

3.3.2.1. Transport uzorka kože

Prirede se sterilne epruvete od 15 mL u koje se stavi po 5 - 7 mL odgovarajućeg medija. Epruvetu s medijem zaštićenu parafilmom preporučuje se dostaviti u malom prijenosnom hladnjaku. Na epruvetu u kojoj je bioptat potrebno je napisati ime i prezime, datum uzimanja biopsije i zajedno sa uputnicom u što kraćem vremenskom roku prebaciti u laboratorij. Ukoliko biopsiju nije moguće odmah obrađivati, može se čuvati u hladnjaku 12 od 48 sati. U radnu bilježnicu odmah po primitku bioptata u laboratorij upisati ime i prezime pacijenta, datum rođenja, odjel s kojeg je stigao uzorak i ime liječnika, ICD-10 šifru i naziv bolesti.

3.3.2.2. Primarna kultura fibroblasta

Primarna kultura fibroblasta uspostavljena je metodom kožnog eksplantata**.** Biopsiju obavezno procesuirati u kabinetu za sterilan rad. Bioptat promjera oko 5 mm prebačen je iz epruvete u Petrijevu zdjelicu. Dobro je ispran s DPBS, usitnjen na manje komadiće (sa skalpelom i škarama) bez prethodnog odvajanja epidermisa od dermisa. Nakon što je biopsija usitnjena na komadiće veličine 2x2 mm ili manje, potrebno ih je pažljivo prenijeti u 25 cm^2 sterilne kultivacijske bočice za adherentne kulture bez medija i ostaviti 10-ak minuta. Kada se komadići kože zalijepe za dno plastične bočice, dodaje se jako oprezno 3-5 mL medija za uzgoj stanica i bočica se čvrsto zatvori. Preporučuje se koristiti kultivacijske bočice koje imaju čep s filterom. Kulture preko noći staviti u inkubator na 37 °C i 5% CO_2. Nakon 24 sata medij promijeniti, a nakon toga tri puta tjedno.

3.3.2.3. Tripsinizacija fibroblasta

Nakon 7 do 10 dana kada je primarna kultura fibroblasta dostigla konfluenciju oko 70% i uz provjeru na invertnom mikroskopu, stanice se tripsiniziraju (Trypsin 0,25% /EDTA 0,02%). Tripsinizacija se postiže na način da se u kabinetu sterilnom pipetom pokupi stari medij iz kultivacijske posude koji može inaktivirati djelovanje tripsina i na stanice se stavi 3-5 mL PBS-a. Nakon toga se lagano pipetom pokupi PBS zajedno sa starim stanicama i ostatkom medija, doda se oko 2 mL tripsina, zatvori čep i kultivacijska zdjelica se ostavi 3-5 minuta u inkubator. Nakon 3 minute provjeri se pod mikroskopom da li su se pokidale međustanične veze između stanica i dna kultivacijske zdjelice, odnosno da li su se stanice odvojile od dna kultivacijske zdjelice. Ukoliko je nastala suspenzija pojedinačnih stanica, potrebno je odmah dodati istu količinu medija

za rast fibroblasta da bi se neutraliziralo djelovanje tripsina. Nakon toga sterilnom pipetom prebaciti suspenziju stanica u epruvetu od 15 mL, centrifugirati na 350 x g, 5 minuta. Nakon centrifugiranja na dnu epruvete vidi se talog i supernatant. Pažljivo ukloniti supernatant, na pelet se stavi novi medij za rast fibroblasta, stanice se dobro resuspendiraju i zasijavaju u nove kultivacijske bočice veličine 25 ili 75 cm^2, ovisno o potrebi. Preporučena količina medija u kultivacijskim bočicama od 25 cm^2 iznosi 3-5 mL, od 75 cm^2 iznosi 12-15 mL medija.

3.3.2.4. Sekundarna kultura fibroblasta

Ovisno o broju dobivenih fibroblasta stanice se raspoređuju u druge subkulture. Svaki put na nove kultivacijske bočice napisati ime prezime pacijenta, datum i broj nove pasaže te datum promjene medija. Stanice se dnevno provjeravaju na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom.

3.3.2.5. Brojanje stanica

Stanična suspenzija oboji se Tripanskim modrilom, i stanice se jednoliko raspršе pipetom. Kap obojene stanične suspenzije stavi se u Neubauerovu komoricu i poklopi pokrovnim staklom. Žive stanice ostaju neobojene. Prebroje se samo stanice kojima nije oštećena membrana, to jest one koje nisu pomodrile. Prije zasijavanja broj vijabilnih stanica u suspenziji prilagodi se dodatkom medija na željenu koncentraciju tj. oko 2 x 10^6 po kulturi, 3 - 5 x 10^4 po cm^2. Stanice su okrugle bez jasno vidljive jezgre.

3.3.3. Izolacija mioblasta

3.3.3.1. Priprema medija za uzgoj mioblasta

Temeljni medij je medij za rast skeletnih mišića (engl. *Skeletal Muscle Cell Growht Medium,* SGM) (Promocell) u koji se, neposredno prije kultivacije, doda još 5% faktora rasta (engl. *Supplement mix*). Taj dodatak čine epidermalni faktor rasta (engl. *Epidermal Growth Factor,* EGF), faktor rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*, FGF) te inzulin. Na to se još doda 10% goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovin Serum*, FBS), 1,5% Glutamaxa 100x (Gibco) i 0,1% Gentamicina (Sigma) (Tablica 4).

Tablica 4. Proliferacijski medij (SGM)

Reagens	Kataloški broj	Proizvođač	Količina u %
Skeletal Muscle Cell Growht Medium	C-23060	PromoCell	83,4 %
Supplement mix (-20 ºC)	C-39365	PromoCell	5 %
FBS	F9665	Sigma	10 %
Gentamicin	15750-037	Gibco	0,1 %
Glutamax 100x (-20 ºC)	35050	Gibco	1,5 %

3.3.3.2. Transport uzorka mišića

Bioptat mišića se u uvjetima kirurške asepse prenosi u prethodno pripremljene sterilne epruvete volumena 15 mL s 5 mL proliferacijskog medija za rast mioblasta. Bioptat je potrebno staviti u epruvetu s proliferacijskim medijem vodeći računa o sterilnosti i što žurnije dostaviti s odjela u laboratorij za staničnu kulturu budući da brzina i potencijal dijeljenja stanica s vremenom opadaju. U radnu bilježnicu se treba odmah pri primitku bioptata upisati ime i prezime pacijenta, datum rođenja, odjel s kojeg je stigao uzorak i ime liječnika, šifru i naziv bolesti.

3.3.3.3. Primarna kultura mioblasta

Postupci stanične kultivacije mioblasta izvode se u kabinetu u sterilnim uvjetima. Dan prije uspostave primarne kulture mioblasta u kabinetu za sterilan rad potrebno je prirediti medij A (Hepes, NaCl, KCl, Glukoza, Phenol red) i medij ATE (Medij A 98,6%, Tripsin 1X 1% i EDTA 0,4%). Priprema medija za rast humanih mioblasta prikazana je sažeto u Tablicama 5, 6, 7 i 8. Svi mediji koji se pripremaju u kabinetu filtriraju se kroz filtere 0,22 μm (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), i skladište na +4 °C. Mediji pripremljeni na ovaj način stabilni su oko mjesec dana. Bioptat skeletnog mišića veličine oko 5 mm^3 nakon što je stigao u laboratorij za kulturu stanica, usitni se enzimskom digestijom u mediju ATE uporabom sterilnog laboratorijskog pribora (igle, skalpeli). Usitnjeni komadići bioptata prebace se u tikvicu Wheaton s 10 mL ATE medija u koji se doda sterilni magnetić. Uz laganu vrtnju u trajanju od 15 minuta na magnetskoj miješalici na 37 °C, mioblasti se postepeno izoliraju iz bioptata. Enzimska digestija prekida se dodatkom 15 mL medija za ispiranje stanica (DMEM 90%, FBS 10%, Gentamicin 0,5%). Ovaj postupak se ponavlja tri puta. Stanična suspenzija i usitnjeni komadići bioptata se prebace u epruvete od 50 mL, centrifugiraju na 350 x g, 5 minuta (centrifuga tip 5810 R, Eppendorf, Njemačka). Pažljivo se odlije supernatant, a na stanični talog u kojem se nalaze mioblasti doda se 5 mL

proliferacijskog medija. Ovako izolirani mioblasti zasijavaju se u kultivacijske bočice od 25 cm^2 (PTT, Austrija) u proliferacijskom mediju i pohrane u inkubator na 37 °C s 5% CO_2 (Kambič, Slovenija). Svaka tri dana a najbolje ponedjeljkom, srijedom i petkom, mijenja se proliferacijski medij u kulturama. Tijekom kultivacije izgled i rast mioblasta prati se pod invertnim mikroskopom s faznim kontrastom (Olympus IX 50) kako bi se mioblasti pravodobno repasažirali (tj. kada kultura postane konfluentna). Također stanice treba redovito kontrolirati radi prisutnosti bilo kojeg oblika kontaminacija.

Tablica 5. Medij A za izolaciju mioblasta iz biopsije mišića

Reagens	Kataloški broj	Proizvođač	Količina u g
HEPES	H 4034	Sigma Best	3,6 g
NaCl			3,8 g
KCl			0,112 g
Glucose			0,99 g
Phenol red			0,567 g
Destilirana H_20			500 mL

Tablica 6. Tripsin otopina

Reagens	Kataloški broj	Proizvođač	Količina
Trypsin stock 1:250	T-4799	Gibco	0,5 g
H_20			10 mL

Tablica 7. EDTA otopina

Reagens	Kataloški broj	Proizvođač	Količina
EDTA 0,5 M stock			1,5 mL
H_20			3 mL

Tablica 8. Medij ATE

Reagens	Količina
Solution A	98,6 %
Tripsin-otopina	1 %
EDTA-otopina	0,4 %

3.3.3.4. Tripsinizacija mioblasta

Stanice se odvoje od podloge i od drugih stanica pod utjecajem enzima tripsina (Sigma) kada prekriju 60-70% dna bočice. Sterilnom pipetom (Hirschmann, Eberstat, Njemačka) se izvuče sav hranjivi medij iz bočice te se na stanice pažljivo doda 5 mL Dulbecco fosfatnog pufera bez Ca^{+2} i Mg^{+2} iona (engl. *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Calcium and Magnesium Free,* DPBS-CMF). Pufer se ostavi 1-2 minute kako bi se isprao proliferacijski medij i kako bi se stanice mogle lakše i brže odvojiti od dna bočice. Nakon toga se sterilnom pipetom ukloni DPBS-CMF medij te se na stanice doda 3-5 mL 0,25% tripsina/1mM EDTA (Sigma). Bočica se stavi u inkubator na 37 ^{o}C, 5 minuta. Ponekad tripsin može na stanice brže djelovati pa se bočice provjeravaju na mikroskopu tri minute nakon što su stavljene u inkubator. Kada su se stanice podigle s dna bočice, djelovanje tripsina se prekida dodatkom 5-7 mL proliferacijskog medija. Pažljivo se resuspendira medij da bi se dobila suspenzija pojedinačnih stanica, koja se zatim centrifugira četiri minute na 350 x g. Supernatant se pažljivo odvoji, a na stanični talog stavi se 1-2 mL proliferacijskog medija. Nakon brojenja stanica zasije se veći broj sekundarnih kultura mioblasta.

3.3.3.5. Sekundarna kultura mioblasta

Skeletni mioblasti zasijavaju se u sekundarne kulture ravnomjerno u gustoći oko $1x10^6$ po kulturi, $3\text{-}5x10^4$ po cm^2. Stanice se inkubiraju u sterilnim uvjetima na +37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO_2 u proliferacijskom mediju. Medij se mijenja sva tri dana. Nakon što su stanice postigle konfluenciju oko 70-80%, mioblasti se tripsiniziraju 0,25% tripsin/1mM EDTA (Sigma), centrifugiraju 350 x g, 5 minuta (centrifuga tip 5810 R, Eppendorf, Njemačka) te ovisno o broju dijele u subkulture ili idu u proces pročišćavanja. Na kultivacijske bočice se obilježi ime i prezime pacijenta, vrsta stanica (pročišćeni ili nepročišćeni mioblasti), broj pasaže i datum mijenjanja medija ili tripsinizacije.

3.3.3.6. Pročišćavanje mioblasta

Nakon što su uspješno izolirane, mišićne stanice se prvo pročiste metodom „preplating", a nakon toga i na magnetskom separatoru (Miltenyi Biotec, GmbH) uz korištenje anti-CD56/NCAM protutijela (Invitrogen).

Pročišćavanje mioblasta metodom „preplating“ temelji se na različitim adherentnim karakteristikama stanica u primarnoj kulturi, pri čemu fibroblasti prije adheriraju u kulturi u odnosu na mioblaste. Na taj se način subkultura može značajno obogatiti mioblastima. Nakon 20 minuta inkubacije na +37 °C i 5% CO_2, supernatant se prebaci iz jedne u drugu kultivacijsku bočicu. Zbog različite brzine adheriranja, većina fibroblasta ostane na dnu bočice, dok je u supernatantu većina mioblasta. Ponavljajući „preplating“ metodu nakon 5 pasaža kultura je bogata s „malim, okruglastim miogenim stanicama“.
Pročišćavanje mioblasta korištenjem magnetskog separatora bazirano je na tome da se prvo mioblasti obilježavaju specifičnim monoklonalnim protutijelom (NCAM; CD56) i s IgG mikrokuglicama, a zatim se na magnetskom MiniMACS separatoru (engl. *Magnetic-activated cell sorting*) (Miltenyl Biotec GmbH) razdvajaju od fibroblasta.

3.3.3.7. Diferencijacija mioblasta u miotube

Diferencijacija mioblasta provodi se kada su mioblasti postigli konfluenciju oko 50-60%. Proliferacijski medij zamjenjuje se s diferencijacijskim medijem (DMEM 94%, konjskim serumom 2-5% (engl. *Horse serum*) i dodaje se Penicilin-Streptomicin 1%). (Tablica 9). Miogenski fuzijski indeks (engl. *Myogenic Fusion Index*, MFI) može se determinirati kao broj jezgri u multinuklearnim miotubama u odnosu na ukupan broj jezgi u vidnom polju.

Tablica 9. Diferencijacijski medij

Reagens	Kataloški broj	Proizvođač	Količina u %
DMEM			94 %
Konjski serum	26050	Gibco Invitrogen	5 %
Antibiotik/antimikotik	A5955	Sigma	1 %

3.3.4. Metoda protočne citometrije

Protočna citometrija je metoda kojom se mjere fizikalna svojstva stanica. Mjerenje raspršenja svjetlosti i fluorescencije koja nastaje prolaskom kroz fokusnu lasersku zraku koja daje informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima stanice. Svojstva koja se mjere su veličina i granuliranost stanica (unutarnja složenost) i relativni intenzitet fluorescencije površinskih ili unutarstaničnih fluorokroma. Bitna karakteristika protočne citometrije je da se ne uzima prosjek svojstava svih stanica u populaciji, nego

se svaka od njih pojedinačno analizira. Metodom se izoliraju skletni mioblasti od smjese drugih stanica i obilježe s CD56+CD45-.

3.3.5. Pohrana bioloških uzoraka

3.3.5.1. Kratkotrajno zaleđivanje stanica na -80 °C

Zaleđivanje stanica provodi se u posebnim epruvetama namijenjenim za duboko zaleđivanje. Epruvete se predhodno označe (ime i prezime pacijenta, vrsta stanica, broj pasaže, datum zaleđivanja, broj stanica) i cijelo vrijeme postupka drže se na hladnoj podlozi. Nakon tripsinizacije i cetrifugiranja, odnosno nakon što je odstranjen supernatant, na talog stanica se stavi 1,7 mL svježe pripremljenog medija za zaleđivanje fibroblasta (DMSO 70%, FBS 20%, DMSO 10%) i za mioblaste (SGM 90% i DMSO 10%) pažljivo resuspendira da se dobiju pojedinačne stanice Tablice 10 i 11. Broj stanica koje su zaleđivane iznosio je oko 1 do 2 x 10^6 po ampuli. Nakon toga, epruvete se stave u ledenicu na -86 ^oC (Thermo Scientific). Nakon 24 sata se spremaju u tekući dušik na -196 ^oC na dugotrajno skladištenje.

3.3.5.2. Dugotrajno zaleđivanje stanica u spremnik tekućeg dušika

U spremnike s tekućim dušikom pohranjuju se obilježeni uzorci (kultivirani fibroblasti, bioptat mišića, jetre i sl.) u epruvetama do 2 mL. Epruvete moraju biti isključivo za zamrzavanje na niskim temperaturama (-196 ^oC). Spremnici s tekućim dušikom smješteni su u zasebnoj prostoriji u kojoj je omogućena stalna cirkulaciju zraka (ugradnjom rešetke na vratima). U prostoriju je dozvoljeno ulaziti samo djelatnicima laboratorija koji rade s tekućim dušikom i djelatnicima stanice za medicinske plinove. Spremnici s tekućim dušikom imaju nosač s kotačima radi lakšeg transporta. Obavezno je nošenje zaštitne odjeće (zaštita lica sa štitom ili naočalama, suhe kriogene rukavice, zaštitna pregača, zatvorena obuća koja se može lako ukloniti u slučaju izlijevanja; preporuka je nositi duge hlače). Kad se ampule stavljaju u tekući dušik, razlika tlaka između vanjske okoline i unutrašnjosti ampule je visoka; tekući dušik će ući u ampulu, tako da kada se odmrzavaju može doći do eksplozije ampule. Odmrzavanje ampula iz tekućeg dušika mora uvijek biti u plastičnoj stiropornoj posudi s poklopcem, uz obavezno nošenje vizira za oči i lice. Voditi evidenciju o mjestu skladištenja uzoraka u obrazac, da bi se u svakom trenutku znalo mjesto i količina pojedinih uzorka u spremniku tekućeg dušika.

Tablica10. Zaleđivanje fibroblasta

Reagens	Kataloški broj	Proizvođač	Količina u %
DMEM	41966	Gibco	70 %
FBS			20 %
DMSO	D2650	Sigma	10 %

Tablica 11. Zaleđivanje mioblasta

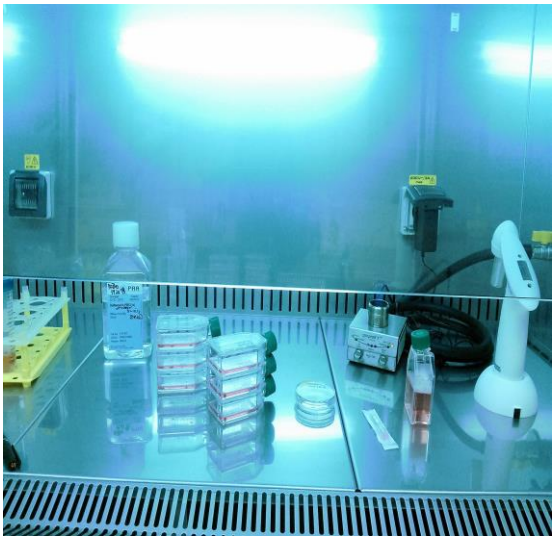
Reagens	Kataloški broj	Proizvođač	Količina u %
Skeletal Muscle Cell Growht Medium	c-23060	PromoCell	90 %
DMSO	D2650	Sigma	10 %

3.3.6. Zaleđivanje bioptata

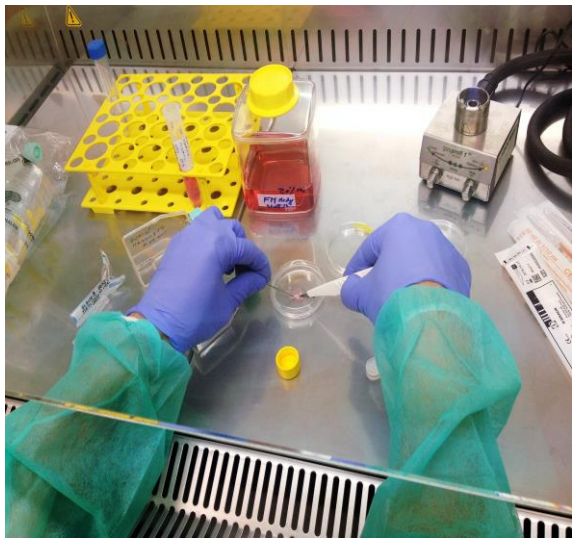
Bioptate (mišiće i jetru) koji su uzeti na odjelu i ampule za zaleđivanje potrebno je pravilno obilježiti i uskladištiti na – 80 ^{o}C ili u tekući dušik. Sve uzorke upisati u bazu podataka.

4. REZULTATI

Sigurnosti aspekti rada sa staničnim kulturama podrazumijevaju procesuiranje staničnih kultura u mikrobiološkom kabinetu za sterilan rad, proštivajući GLP i GMP. (Slike 12 i 13). Stanična kultura kožnih fibroblasta je optimalan a u većini slučajeva i neophodan biološki materijal za provođenje testova potvrde svih bolesti nakupljanja.



Slika 12. Sigurnosni aspekti rada sa staničnim kulturama



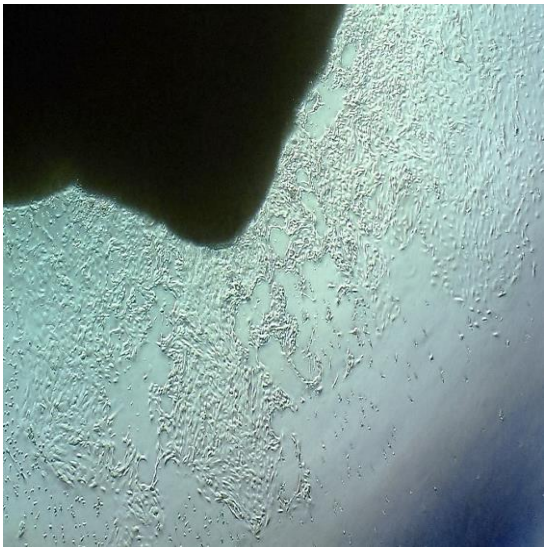
Slika 13. Procesuiranje biopsije kože

4.1. KULTURA FIBROBLASTA

Klinička sumnja na lizosomske bolesti nakupljanja postavlja se na osnovu kliničke slike i osnovnih laboratorijskih nalaza kao što su anemija, trombocitopenija a u perifernom razmazu krvi vide se vakuolizirani leukociti. Nakon osnovnih laboratorijskih nalaza daljnja dijagnostika se nastavlja u specijaliziranim laboratorijima za nasljedne metaboličke bolesti s testovima probiranja kao što su mukolisaharidoze, sfingolipidoze, oligosaharidoze i lipidi u urinu. Krajnja potvrda dijagnoze postavlja se iz enzima u serumu, leukocita ili kulture kožnih fibroblasta. Najčešće se u potvrdi dijagnoze koriste leukociti jer ih je lako izolirati i u kratkom vremenskom roku dobije se prikladan materijal za dijagnostiku. Prije uzimanja biopsije potrebno je dogovoriti s djelatnicima u metaboličkom laboratoriju medij za uzimanje biopsije kao i točno vrijeme kada bi se biopsija poslala u laboratorij i koža procesuirala. Poznato je da u području nasljednih metaboličkih bolesti mnogi enzimi mogu biti u nedostatku kod novorođenčadi, a stanična kultura fibroblasta je često najprikladniji materijal za enzimsku potvrdnu

analizu (Tablice 12 i 13). Međutim uspostava primarnih i sekundarnih kultura fibroblasta je dragocjen materijal ne samo radi potvrde dijagnoze lizosomskih bolesti nakupljanja nego i zbog toga šte se iz njih mogu napraviti naknadne analize i izolirati DNA.

Prvi fibroblasti se mogu vidjeti nakon 2-3 dana. Iz bioptata kože fibroblasti spontano nastavljaju izlaziti i popunjavati dno plastične kultivacijske bočice (Slike 14 i 15). Da bi stanice bile zdrave i aktivno rasle u jednom sloju neophodno ih je pravovremeno dijeliti u subkulture.

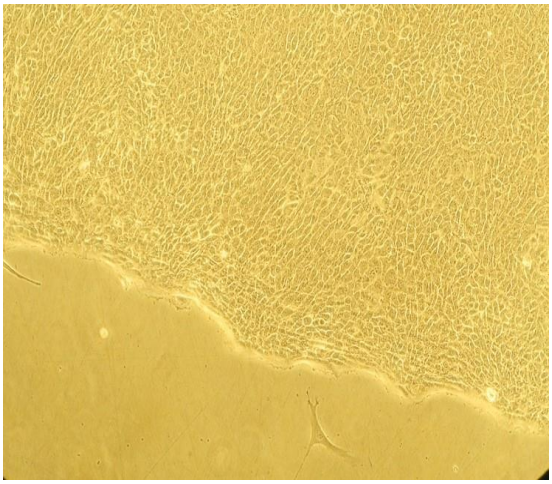


Slika 14. Eksplantat kože i primarna kultura fibroblasta 50% gustoće (uvećanje 400x)



Slika 15. Kultura fibroblasta 90% gustoće (uvećanje 400x)

Iz bioptata kože uz fibroblaste mogu se vidjeti i druge stanice kože, keratinociti tj. epidermalne stanice koje sa svojim faktorima rasta potiču rast fibroblasta (Slike 16 i 17). Često se u primarnim kulturama mogu vidjeti velike kolonije keratinocita ali s vremenom ih prerastu fibroblasti, stanice dermisa. U sekundarnim kulturama imamo samo fibroblaste koji su nam potrebni za analizu lizosomskih bolesti nakupljanja.



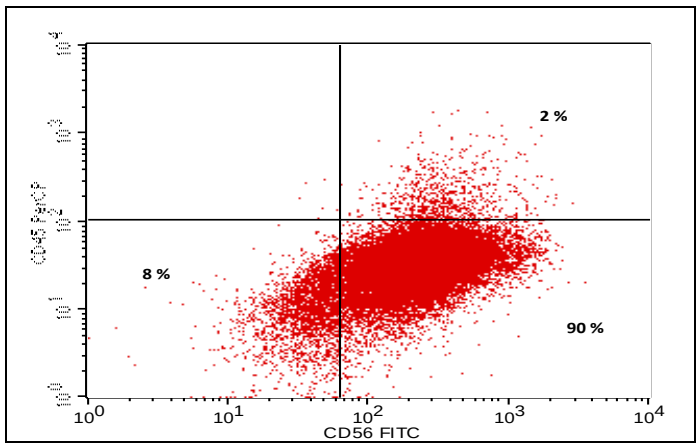
Slike 16. Primarna kultura keratinocitia 50% gustoće (uvećanje 400x)



Slika 17. Primarna kultura keratinocita 100% gustoće (uvećanje 400x)

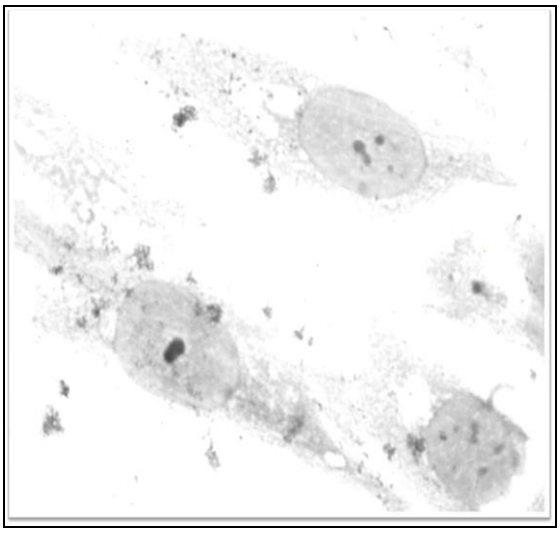
4.2. KULTURA MIOBLASTA

Kultura mioblasta kao model za istraživanje miopatija uspostavljena je na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti jer daju mogućnost razumijevanja miopatija. Zbog toga je od iznimne važnosti uspostava kulture mioblasta kao modela za daljnje istraživanje patogeneze miopatija i matičnih stanica. Svako mišićno vlakno okružuje tanki sloj vezivnog tkiva, a pojedine snopove mišićnih vlakana odvaja obilje veziva s masnim stanicama i krvnim žilama. Otuda prisutnost fibroblasta, stanica vezivnog tkiva u kulturi s mioblastima. Kontrola pročišćenosti mioblasta i vijabilnost stanica provjerene su metodom protočne citometrije (Slika 18).

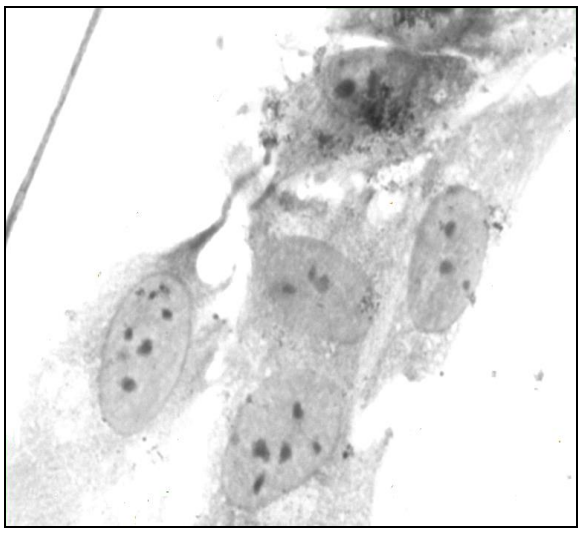


Slika 18. Mioblasti, pozitivno obilježene stanice (CD56+) odvojene su od fibroblasta koje nisu imale biljeg (CD56-) korištenjem magnetskog staničnog separatora (MACS) i koristeći specifična antitijela (anti-CD56).

Optimiziran je broj pročišćenih mioblasta u kultivacijskim bočicama. Nekoliko dana nakon zasijavanja primarne kulture mioblasta na dnu kultivacijske posude mogu se vidjeti pojedinačno izolirane matične stanice mišića (Slika 19a i 19b). Za 7 do 10 dana stanice će se podijeliti i pokrivati oko 60% dna posude i spremne su za presađivanje u sekundarne kulture (Slika 20).



Slike 19a. Pročišćeni mioblasti (uvećanje 1000x)



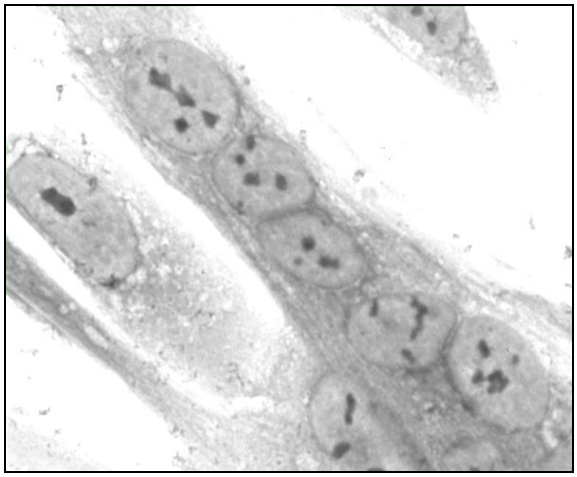
19b. Pročišćeni mioblasti (uvećanje 1000x)



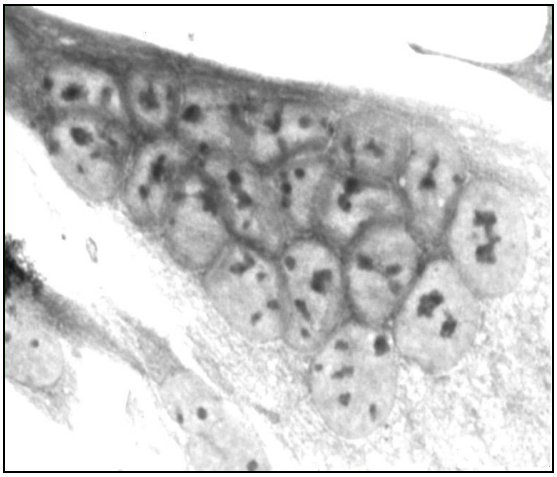
Slika 20. Gustoća mioblasta oko 60% gustoće u pročišćenim kulturama (uvećanje 400x)

4.3. DIFERENCIJACIJA MIOBLASTA U MIOTUBE

Nakon što su uspostavljene primarne i sekundarne kulture mioblasta te nakon što su mioblasti pročišćeni magnetskim separatorom, diferencirani su u miotube. Mioblasti su čuvani u diferencijacijskom mediju koji sadrži 2% konjskog seruma od 4 do 6 dana. Nakon 6 dana u kulturi se mogu vidjeti stanice koje sadrže više jezgri, stvarajući miotube (Slike 21a i b). Diferencijacija mioblasta u miotube može se pratiti na mikroskopu s faznim kontrastom (Olympus IX 50).



Slike 21a. Prikaz miotuba u kulturi (uvećanje 1000x)



21b. Prikaz miotuba u kulturi (uvećanje 1000x)

4.4. DIJAGNOSTIKA LIZOZOMSKIH BOLESTI NAKUPLJANJA

Dijagnoza lizosomskih bolesti najčešće započinje kvantitativnom analizom glikozaminoglikana u 24 satnom urinu. U spektrofotometrijskoj reakciji koristi se boja dimetilen-plavilo koja se veže za polisaharidne lance GAG-a. Obojenje je proporcionalno koncentraciji GAG-a. Međutim, ukoliko se nađe povećano izlučivanje glikozaminoglikana ili ako se radi o starijem djetetu s normalnim izmjerenim kvantitativnim vrijednostima GAG ali suspektnom kliničkom slikom (izlučivanje GAG se smanjuje s odrastanjem) preporučuje se napraviti kromatografiju GAG-a. Frakcije glikozaminoglikana koje se mogu naći su hondroitin sulfat, heparan sulfat, dermatan sulfat te keratan sulfat. Kao test potvrde osnovne aktivnosti enzima koristi se homogenat leukocita. U velikom broju nasljednih metaboličkih bolesti, stanična kultura fibroblasta predstavlja jedan od najbitnijih uzoraka za potvrdu dijagnoze (Tablice 12 i 13). Najveći broj pacijenata ima mukopolisaharidozu tipa I i Gaucherovu bolest.

Tablica 12. Dijagnosticirane mukopolisaharidoze

MPS	Naziv MPS	OMIM	Enzim koji nedostaje	Test potvrde	Broj pacijenata
I	Hurler, Hurler-Scheie ili Scheie	252800	α-iduronidaza	Leukociti Fibroblasti	**15**
II	Hunter	309900	Iduronat -2-sulfataza	Leukociti Fibroblasti	**8**
III A	Sanfilippo A	252900	heparan N-sulfataza	Leukociti Fibroblasti	**6**
III B	Sanfilippo B	252920	α-N-acetilglukozaminidaza	Leukociti Fibroblasti	**0**
III C	Sanfilippo C	252930	AcCoA; α-glukozaminid acetiltransferaza	Leukociti Fibroblasti	**0**
III D	Sanfilippo D	252940	N-acetilglukozamin- sulfataza	Leukociti Fibroblasti	**9**
IV A	Morquio A	253000	N-acetilgalaktoamin-6-sulfataza	Leukociti Fibroblasti	**0**
IV B	Morquio B	253010	β-galaktozidaza	Leukociti Fibroblasti	**8**
VI	Maroteaux-Lamy	253200	N-acetilgalaktozamin-4-sulfataza	Leukociti Fibroblasti	**2**
VII	Sly	253220	β-glukuronidaza	Leukociti Fibroblasti	**0**

Tablica 13. Dijagnostika sfingolipidoza

Lizozomska bolest	Naziv sfingolipidoze	OMIM	Enzim koji nedostaje	Test potvrde	Broj pacijenata
Cerebrozidaza	Gaucherova bolest tip I, II i III	230800 230900 231000	Glukocerebrozidaza	Leukociti Fibroblasti	**25**
Cerebrozidaza	Krabbeova bolest	245200	Galkozilceramidaza	Leukociti Fibroblasti	**4**
Neimann-Pickova bolest	tip A i B	257200	Kisela sfingomijelinaza	Leukociti Fibroblasti	**6**
Neimann-Pickova bolest	tip C	257200	Poremećaj esterifikacije egzogenog kolesterola	Fibroblasti	**4**
Gangliozidoze	MG1	230500	β- galaktozidaza	Leukociti Fibroblasti	**4**
Gangliozidoze	MG2 Tay-Sachs	272800	β-heksozaminidaza A	Leukociti Fibroblasti	**2**
Gangliozidoze	MG2 Sandhoff	268800	β-heksozaminidaza A i B	Leukociti Fibroblasti	**6**
Ceramidoza	Farberova bolest	228000	Kisela ceramidaza	Leukociti Fibroblasti	**2**

4.5. PRIKAZ BAZE PODATAKA

Neophodno je pravilno obilježavanje uzoraka u bazi podataka. U skladu s EBB u bazu se upisuje: ime i prezime pacijenta, datum rođenja, odjel i liječnik koji je zatražio analizu, datum kada su uzorci pohranjeni u tekući dušik, vrstu tkiva (stanice ili bioptat), dijagnozu i šifru dijagnoze prema ICD-10, te osobu koja je uzorke uskladištila (Tablica 14).

Tablica 14 **.** Prikaz dijela baze podataka prilagođen međunarodnoj klasifikaciji bolesti ICD-10

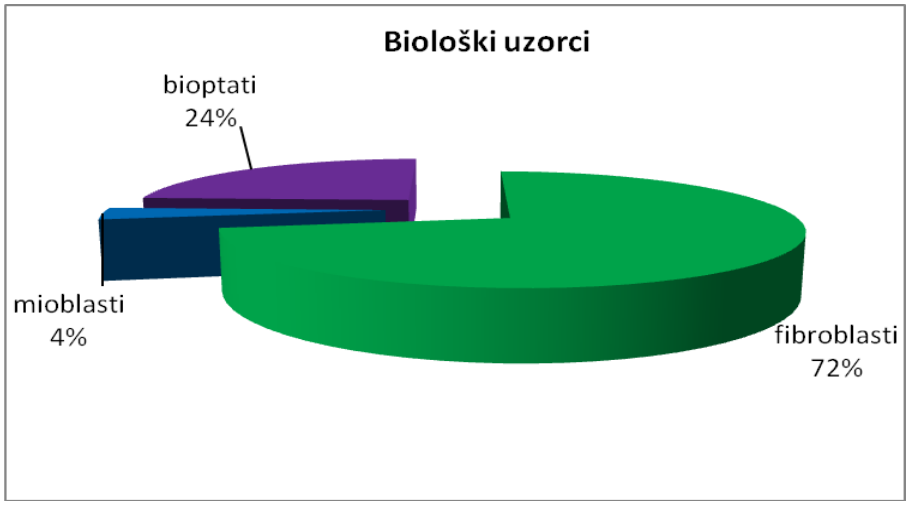
M	Ime i prezime datum rođenja	Odjel/ Liječnik	Datum zamrzavanja	Vrsta tkiva /stanica	Dijagnoza	Šifra ICD-10	Operater
1	**Ž.L.** 30.11.2013.	JID Dr. D. Ramadža	21.10.2014.	fibroblasti	Izostanak očekivanog razvoja	R62	Zekušić
2	**Ž.L.** 30.11.2013.	JID Dr. D. Ramadža	21.10.2014.	fibroblasti	Izostanak očekivanog razvoja	R62	Zekušić
3	**K.D.** 20.04.2013	DKR-ZZM prof.dr. I. Barić	21.10.2014	fibroblasti p=0	Prolazni metabolički poremećaj, nespec.	E88.9	Zekušić
4	**K.D.** 20.04.2013.	DKR-ZZM prof.dr. I. Barić	21.10.2014	fibroblasti p=1	Prolazni metabolički poremećaj, nespec.	E88.9	Zekušić
5	**K.D.** 20.04.2013	DKR-ZZM prof.dr. I. Barić	21.10.2014	fibroblasti p=0	Prolazni metabolički poremećaj, nespec.	E88.9	Zekušić
6	**Ž.L.** 30.11.2013.	JID Dr. D. Ramadža	21.10.2014	fibroblasti	Izostanak očekivanog razvoja	R62	Zekušić
7	**Ž.L.** 30.11.2013.	JID Dr. D. Ramadža	21.10.2014	fibroblasti	Izostanak očekivanog razvoja	R62	Zekušić
8	**P.P.** 19.09.2014.	DKR-ZZM prof.dr. I. Barić	31.12.2014	fibroblasti p=0	Poremećaj metabol. ornitina	E72.3	Zekušić
9	**P.P.** 19.09.2014.	DKR-ZZM prof.dr. I. Barić	31.12.2014	fibroblasti p=0	Poremećaj metabol. ornitina	E72.3	Zekušić
10	**P.P.** 19.09.2014.	DKR-ZZM prof.dr. I. Barić	31.12.2014	fibroblasti p=0	Poremećaj metabol. ornitina	E72.3	Zekušić
11	**M.I.** 10.12.2009.	Klaićeva bolnica prof.dr.I. Barišić	16.12.2014	fibroblasti p=1	Spina bifida, hepatosplenom	Q05.9	Zekušić
12	**M.I.** 10.12.2009.	Klaićeva bolnica prof.dr.I. Barišić	16.12.2014	fibroblasti p=1	Spina bifida, hepatosplenom	Q05.9	Zekušić
13	**M.I.** 10.12.2009.	Klaićeva bolnica prof.dr.I. Barišić	16.12.2014	fibroblasti p=1	Spina bifida, hepatosplenom	Q05.9	Zekušić
14	**M.I.** 10.12.2009.	Klaićeva bolnica prof.dr.I. Barišić	16.12.2014	fibroblasti p=1	Spina bifida, hepatosplenom	Q05.9	Zekušić
15	**Ž.L.** 30.11.2013.	JID Dr. D. Ramadža	21.10.2014	fibroblasti	Izostanak očekivanog razvoja	R62	Zekušić

4.6. VANJSKA PROCJENA KONTROLE KVALITETE

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti je aktivni sudionik programa Europske kontrole kvalitete u području nasljednih metaboličkih bolesti (engl. *European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolis,* ERNDIM) od 1995. godine s ciljem unaprijeđenja kvalitete rada, interpretacije nalaza i postavljanja sigurne dijagnoze. Godišnje se dobija 6 uzoraka koji su liofilizirani serumi humanih fibroblasta. U usporedbi rezultata sudjeluje 76 laboratorija iz 29 europskih država koji su se registrirali za ovu shemu. Od laboratorija se zahtjevalo da pošalju rezultate svakih 6 tjedana. Traži se izračun ukupnih proteina i aktivnost 10 enzima uz interpretaciju nalaza. Za svaki rezultat maksimalan broj bodova je 2 za svaki enzim npr. 1 za dijagnozu i 1 za koeficijent varijacije. Točnost laboratorijske dijagnostike (10 enzima) za lizozomske bolesti nakupljanja u 2014. godini iznosila je 90%.

4.7. SAKUPLJENI BIOLOŠKI UZORCI

U zadnjih 20 godina uzgojeno je 1002 stanične linija fibroblasta i 48 kultura skeletnih mioblasta. Uz stanične linije prikupljeno je 337 uzoraka različitih bioptata (uglavnom mišića i jetre) izoliranih od pacijeneta s nasljednim metaboličkim bolestima (Slika 22).



Slika 22. Biološki uzorci u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti

5. RASPRAVA

5.1. ISTRAŽIVANJE NA MATIČNIM STANICAMA

Matične stanice su zainteresirale znanstvenike širom svijeta s ciljem izolacije, dugotrajnog uzgoja i uspostavljanja matičnih staničnih linija zbog sposobnosti kontrole njihove diferenciranosti u različite vrste stanica i tkiva. Znanstvenici se nadaju da će uzgoj matičnih stanica u kulturi i njihova diferencijacija dovesti do značajnijeg napretka u različitim područjima laboratorijske medicine, kao što su dijagnostika molekularnih i metaboličkih bolesti, farmakološka i toksikološka ispitivanja i genska terapija. Laboratorijska istraživanja na matičnim stanicama znanstvenicima omogućuju shvaćanje bitnih svojstava matičnih stanica i što ih čini različitim od specijaliziranih stanica. Matične stanice se već koriste za istraživanje novih terapija i kao model usporedbe normalnog rasta stanica u odnosu na rast stanica izazvanih određenim nasljednim bolestima (Gulbins i sur. 2002; Kim i sur. 2015). Istraživanje na matičnim stanicama i dalje nastavlja unaprjeđivati znanje o tome kako se organizam razvija iz jedne matične stanice i kako se bolesne stanice u organizmu zamjenjuju zdravima. Istraživanje matičnih stanica je jedno od najperspektivnijih područja suvremene biologije jer otvara široko područje primjene u regenerativnoj medicini.

5.2. MATIČNE STANICE U MEDICINI

Ljudske embrionalne i tkivne matične stanice imaju prednosti i nedostatke obzirom na mogućnosti primjene u regenerativnoj terapiji. Velika razlika između njih je u sposobnosti diferencijacije i proliferacije. Embrionalne matične stanice mogu postati bilo koja stanica u tijelu jer su pluripotentne. Tkivne matične stanice su po tom pitanju limitirane (Ehnert i sur. 2009). Embrionalne matične stanice je lakše uzgojiti u kulturi dok tkivnih matičnih stanica ima znatno manje u odraslom tkivu u odnosu na diferencirane stanice, pa je njihov uzgoj još veći izazov. Još nije razrađena najbolja metoda kojom bi se povećao broj izoliranih matičnih stanica u primarnoj kulturi jer je za kliničku primjenu potreban veći broj matičnih stanica. Tkivo nastalo od embrionalnih matičnih stanica može izazvati odbacivanje za razliku od tkiva dobivenog od autolognih stanica. Tkiva nastala od adultnih matičnih stanica imaju manju vjerojatnost odbacivanja nakon transplantacije jer se pacijentove stanice mogu kultivirati *in vitro*, diferencirati i

vratiti ponovo pacijentu te je manje vjerojatno da će takav presadak odbiti njegov imunološki sustav. Ta činjenica daje tkivnim matičnim stanicama značajnu prednost jer nije potrebno koristiti imunosupresive i druge lijekove za sprječavanje nuspojava (www.eurostemcell.org). Mioblasti u kulturi mogu se koristiti kao buduća stanična terapija kardiomiopatija (Gulbins i sur. 2002). Manjak S-adenozil-homocistein hidrolaze (SAHH) dokazan je kod devet bolesnika (Barić i sur. 2012). Iako je klinička slika varijabilna, svi bolesnici koji boluju od ove više organske bolesti od rođenja imaju miopatiju i značajno povišenu serumsku aktivnost enzima kreatinin kinaze. Inače, povećana aktivnost kreatinin kinaze u serumu primijećena je nakon naporne fizičke aktivnosti te kod mišićnih degenerativnih bolesti kao što su mišićne distrofije (Anderson i Kunkel 1992). Liječenje ima povoljan učinak na neke kliničke i biokemijske parametre, ali u mišićima izostaje pozitivan učinak ili je on mnogo manji. Keratinociti, kožne matične stanice su se koristile od 1980-ih kao nova uzgojena epiderma u laboratoriju (tzv. epidermalni presadci) za liječenje pacijenata s teškim opeklinama. Međutim, ovako uzgojena koža *in vitro* nema folikule dlaka, znojne žlijezde, lojnice tako da je tu tehniku potrebno usavršavati.

Matične stanice iz pupkovine omogućuju bezbolnu izolaciju matičnih stanica, dok primjena matičnih stanica iz koštane srži uključuje invazivan postupak. Matične stanice iz krvi pupkovine nisu prošle proces starenja kao matične stanice iz koštane srži te samim time imaju mnogo veće sposobnosti diferenciranja. Zadnjih godina raste broj biobanki koje pohranjuju matične stanice iz krvi pupkovine za moguće korištenje pri liječenju pacijenta s leukemijama (Munoz i sur. 2014). Mezenhimske matične stanice izolirane iz krvi pupkovine imaju mogućnost regeneracije vezivnog tkiva kao što su hrkavica i kost, kod oštećenja kože, jetre i kod drugih neuroloških smetnji (Schmitt i sur. 2012; Liu i sur. 2014; Kim i sur. 2015; Martinez i sur. 2014).

Aktualni izazovi s kojima se suočavaju istraživanja na ESC su etička pitanja i potreba da se osigura potpuna diferenciranost ESC u potrebne specijalizirane stanice prije transplantacije. Važno je napomenuti da istraživanje u području transplantacije ne znači samo iskorištavanje hiPSCs i hESCs nego i primjenu u farmakološkim istraživanjima. Prije primjene novih lijekova na ljudima neophodno je testirati terapiju na životinjama za utvrđivanje da li se pojavljuju neželjeni učinci na cijelo tijelo ili se reflektiraju na pojedine organe. Međutim, nakon ovog otkrića raste interes farmaceutske industrije u iskorištavanju ovih vrsta matičnih stanica s ciljem smanjenja istraživanja na životinjama.

5.3. ORGANIZACIJA BIOBANKI TKIVA I STANICA

U zadnjih 30 godina zdravstveni sustav u svijetu je napravio veliki napredak, recimo, pacijenti koji boluju od tumora žive 4 puta duže, oko 30% manje ljudi umire od kardiovaskularnih bolesti, a istraživanje na biološkim uzorcima je doprinijelo ovim dostignućima. Istraživanje na ovim uzorcima ima za cilj povezivanje znanosti i medicine. Uzorak čim pristigne u biobanku dobije specifični kod na osnovu kojeg će se u slučaju potrebe identificirati. Međutim, u istraživačke svrhe uzorak ostaje anoniman te jedino ukoliko postoji potreba (kao u slučaju laboratorijske dijagnostike) uzorak se može povezati sa donorom i njegovim kliničkim podacima. Uzorci kao što su stanične kulture testiraju se na kontaminaciju mikoplazmama, virusima i bakterijama te se na kraju skladište u biobanku na -80 °C ili na dugotrajno skladištenje na -196 °C. Uzorci spremljeni na ovaj način su spremni za distribuciju istraživačima koji rade na različitim bolestima s krajnjim ciljem poboljšavanja načina liječenja i brige za pacijenta.

Za biobanku je najbolje da je smještena u sklopu specijaliziranog laboratorija i trebala bi biti registrirana od strane Ministarstva zdravlja i definirana što se tiče osoblja, opreme i organizacije. Također, biobanka treba imati mogućnost skladištenja bioloških uzoraka u ledenice i tekući dušik te prikladnu ostalu laboratorijsku opremu kao što su CO_2 inkubatori, mikrobiološki kabineti klase II, invertni mikroskop, centrifugu, kompjutere za upisivanje podataka i povezivanje s internetom. Svi podaci u biobanci moraju imati sistem zaštite od prekida električne energije. U namjeri usklađivanja laboratorijskih protokola, standardi su usklađeni prema EBB za zaprimanje uzoraka, uvjeta rada i okoliša, osoblja, opreme i metoda procesiranja, skladištenja i distribucije uzoraka (www.eurobiobank.org).

5.3.1. Značaj biobanki

S namjerom da se iskoristi potencijal matičnih stanica, znanstvenici bi se trebali usmjeriti s pojedinačnih sporadičnih istraživanja u zajedničku kolaborativnu snagu. Jedan od pristupa je uspostavljanje spremišta matičnih stanica koje je dostupno zajedničkim istraživanjima. Ovo bi minimaliziralo korištenje humanog tkiva i različiti istraživači ne bi radili isti dio posla. Sav biološki materijal može se uskladištiti za buduću autolognu uporabu, istraživanje, edukaciju ili kontrolu kvalitete (Grizzle i sur. 1999).

5.3.2. Povjerljivost podataka

Obilježavanje uzoraka može biti od nepovratne anonimnosti do potpune identifikacije, ovisno o načinu klasificiranja uzoraka u biobanci (Cambon-Thomsen i sur. 2007). Potpuno anonimno se označavaju uzorci tako što se identificiraju samo pomoću koda. Podaci o pacijentu nisu zabilježeni te je stoga nemoguće praćenje podataka od uzorka do pacijenta. Za razliku od potpuno anonimnog registriranja, postoji mogućnost povezivanja uzorka s pacijentom čije podatke znaju samo djelatnici biobanke. Ova mogućnost praćenja od uzorka do donora se radi samo ako pacijent ima dobrobit od toga, npr. potvrdu dijagnoze. Praćenje podataka od uzoraka do pacijenta nije potrebno kada se uzorci koriste samo za znanstvene svrhe pa informacija nije korisna za donora. Postoji opcija potpune identifikacije uzorka kada je moguće identificirati pacijenta imenom, prezimenom i adresom. Ova opcija je moguća uz zahtjev zainteresirane osobe za osobno ili obiteljsko korištenje (laboratorijska dijagnostika). Kao što je spomenuto prije, biobanke mogu biti korisne ne samo za živuće generacije već i za buduće (u interesu porijekla obitelji). Kao rezultat, neophodna je mogućnost identifikacije svakog pohranjenog uzorka. Procedura kodiranja uzorka je najvažnija za zaštitu privatnosti donora kao i dozvola korištenja uzorka za istraživačke svrhe (Trouet 2004). Osobni podaci donora ili druge informacije koje lako mogu doći do povezivanja sa uzorkom se nikada ne smiju pojaviti na kodu i popratnoj dokumentaciji uz uzorak, osim u situaciji kada je cilj povezati podatke sa uzorkom.

5.3.3. Distribucija uzoraka

Na zahtjev istraživača, distribucija uzoraka iz biobanke mora biti besplatna, odnosno plaćaju se samo troškovi transporta. Mnogi uzorci se čuvaju za donora i/ili za istraživače koji analiziraju uzorke koji nemaju postavljenu dijagnozu bolesti. Najčešće metoda analiziranja je sekvenciranje gena. Za korištenje uzoraka iz biobanke mora se ispuniti obrazac (ime i prezime, adresu, telefon, fax, email adresu, tip uzorka koji se traži, interese za koji se koristi uzorak, kratak opis projekta istraživanja i cilj). Uzorak dobiven iz biobanke ne može se koristiti za komercijalne svrhe i ne smije se dati drugom istraživaču bez pristanka odgovorne osobe iz biobanke (Cambon-Thomsen i sur. 2007). Prilikom publiciranja rezultata koji su dobiveni od biološkog materijala, neophodno je kopiju poslati u biobanku. Uzorci se neće slati bez potpisanog obrasca.

5.3.4. Kontrola kvalitete i neophodni uvjeti za uspostavljanje biobanke

Upravljanje kontrolom kvalitete je neophodno u medicinskim laboratorijima s ciljem definiranja SOP-ova vezano uz prikupljanje, procesuiranje, skladištenje i raspodjelu uzoraka i podataka u skladu sa standardima GLP/GMP i ISO 15 189. Da bi se uspostavila Biobanka za rijetke bolesti u Hrvatskoj uz rezultate ovoga diplomskog rada neophodno je:

- U Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti osigurati standardne protokole kojima se kontrolira da stanične kulture nisu kontaminirane mikoplazmama, bakterijama i gljivicama tijekom rasta kulture, skladištenja i odmrzavanja iz tekućeg dušika.
- Izmijeniti informirani pristanak pacijenta na način da se istakne kako će se biološki materijal koristiti za dijagnostičke i terapijske svrhe te da će se višak materijal iskoristiti za istraživačke svrhe (Salvaterra i sur. 2008). Naglasiti u informiranom pristanku pacijenta da će njihov uzorak doprinijeti istraživanju, razumijevanju prirode bolesti i razvoju novih dijagnostičkih i terapeutskih postupaka (Prilog 3. Primjer informiranog pristanka pacijenta u EU).
- Službeno prijaviti u Ministarstvo zdravlja Biobanku za rijetke bolesti, odnosno zatražiti imenovanje, odobravanje ili izdavanje dozvole za rad banke tkiva i stanica. Prijaviti biološke uzorke iz KZLD-a, poput DNA/RNA uzoraka, staničnih linija, različitih bioptata, uzoraka plazme/seruma i drugo, u jednu zajedničku biobanku, po primjeru organizacije biobanki u Italiji (Filocamo i sur. 2013). Prikupljanje uzoraka DNA može se iskoristiti za sekvenciranje novih gena i mutacija te korelaciju genotipa i fenotipa (Magri i sur. 2011). Uzorci seruma ili plazme bi pomogli u otkrivanju novih biomarkera. Ostali uzorci kao što su mRNA, stanične linije i bioptati doprinijeli bi otkrivanju novih terapija za rijetke bolesti. Za osnivanje i održavanje biobanke potrebna su znatna financijska sredstva koja su do danas za kupovinu nove opreme uglavnom dobivena preko projekata Ministarstva zdravlja RH. S ciljem osnivanja biobanke optimalno bi bilo posjetiti jednu uspostavljenu biobanku za rijetke bolesti u EU te prenijeti znanja, neophodne uvjete i procedure u Hrvatsku u skladu sa EBB i akreditacijskim zahtjevima. Biobanka se mora ograditi o potencijalnog profita i pridržavati se EU Direktive 98/44/EZ o pravnoj zaštiti biotehnoloških izuma. Moguća opcija je i prikupljene uzorke i pripadajuće podatke o pacijentu za rijetke bolesti pripojiti već uspostavljenim i imenovanim biobankama u Hrvatskoj od strane Ministarstva zdravlja (Borovečki i sur. 2014).

- Svu opremu redovito validirati i servisirati, a osoblje redovito educirati pridržavajući se GLP, GMP i ISO 15 189. Standardi vezani uz laboratorijsku opremu podrazumijevaju periodično provjeravanje i validiranje opreme.
- Pristup tekućem dušiku zabraniti za svo osoblje osim za djelatnike biobanke. Spremnici s tekućim dušikom se trebaju periodično kontrolirati. Identifikacija uzoraka i povezanost s mjestom u spremniku mora biti strogo kontrolirano, broj pasaže kao i problemi s rastom ako ih je bilo. Biološki uzorci u biobanci bi se trebali alikvotirati u dva ili više alikvota i uskladištiti u odvojene ledenice. Ukoliko se radi o staničnim kulturama, skladište se u dva odvojena spremnika tekućeg dušika.
- Redovito sudjelovati u Europskoj kontroli kvalitete u području nasljednih metaboličkih bolesti. Dobiven je certifikat za 2014. godinu od ERNDIM-a za laboratorijsku dijagnostiku lizozomskih bolesti nakupljanja i točnost analiza iznosi 90%.

Bilo da se radi o laboratorijskoj dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti, budućoj mogućoj terapiji ili istraživanju na matičnim stanica ostvareni su svi preduvjeti da se uspostavi biobanka tkiva i stanica otvarajući mnoga etička, zakonska i socijalna pitanja.

6. ZAKLJUČAK

1. Uspostavljena je primarna i sekundarna kultura humanih fibroblasta i skeletnih mioblasta izoliranih od pacijenata s rijetkim nasljednim bolestima u skladu s dobrom laboratorijskom i proizvođačkom praksom.

2. Napisane su radne upute vezane uz rad na opremi te za prikupljanje, procesuiranje, skladištenje i raspodjelu uzoraka za dijagnostiku i istraživanje u skladu sa standardima EBB i ISO 15 189.

3. Baza podataka je usklađena s Međunarodnom klasifikacijom bolesti ICD-10.

4. U bazu podataka je upisano anatomsko porijeklo biološkog uzorka i broj pasaže staničnih kultura.

5. Stvoreni su preduvjeti za osnivanje Biobanke tkiva i stanica za rijetke bolesti.

6. Uzgojene su 1002 stanične kulture fibroblasta i 48 kultura skeletnih mioblasta, uskladištena su 337 bioptata mišića i jetre pacijenata s nasljednim metaboličkim bolestima.

7. Dijagnosticirana je 101 lizosomska bolest nakupljanja (48 mukopolisaharidoza i 53 sfingolipidoze).

8. Zbog svega navedenog, neophodna je kontinuirana suradnja između kliničkog i laboratorijskog osoblja od prikupljanja biološkog materijala pa sve do potvrde dijagnoze i u konačnici bolje brige za pacijente.

7. POPIS LITERATURE

Anderson M.S., Kunkel L.M. (1992): The molecular and biochemical basis of Ducharme muscular dystrophy. Trends Biochem Sci **17**: 289-292.

Barić I., Ćuk M., Fumić K., Vugrek O., Allen R.H., Glenn B., Maradin M., Pažanin L., Pogribny I., Radoš M., Sarnavka V., Schulze A., Stabler S., Wagner C., Zeisel S.H., Mudd S.J. (2005): S-Adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: a second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. J Inher Metab Dis **28**: 885-902.

Barić I, Ćuk M, Petković-Ramadža D., Bilić K., Zibar K., Sarnavka V., Vugrek O., Burlina A., Mudd S.H., Fumić K. (2012): S-adenosylhomocysteine Hydrolase deficiency - a review of nine patients. Mol Genet Metab **105**: 303.

Bischoff R. (1994): The satellite cell and muscle regeneration. In Myology (eds. A.G. Engel and C. Frazini-Armstrong) McGraw-Hill, New York 97–118.

Borovečki A., Caenazzo L., Ježek D., Karija-Vlahović M., Golubić B. (2014): Croatian National Centre for Biobanking – a new perspective in biobanks governance? Croat Med J **55**: 416–422.

Budimir D, Polasek O, Marušić A, Kolčić I, Zemunik T, Boraska V, Jerončić A, Boban M, Campbell H, Rudan I. (2011): Ethical aspects of human biobanks: a systematic review. Croat Med J **52**: 262-79.

Cambon-Thomsen A., Rial-Sebbag E., Knoppers B.M. (2007): Trends in ethical and legal frameworks for the use of human biobanks. Eur Respir J **30** (2): 373-82.

Campbell K.H.S., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I.. (1996): Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature **380**: 64–66.

Cornelison D., Wold B. (1997): Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. Dev Biol **191**: 270–283.

Direktiva 98/44/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. srpnja 1998. o pravnoj zaštiti biotehnoloških izuma.

Ehnert S., Glanemann M., Schmitt A., Vogt S., Shanny N., Nussler N.C., Stöckle U., Nussler A. (2009): The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? Arch Surg **394**: 985–997.

Filocamo M., Baldo C., Goldwurm S., Renieri A., Angelini C., Moggio M., Mora M., Merla G., Politano L., Garavaglia B., Casareto L., Bricarelli F.D; Telethon Network of Genetic Biobanks Staff. (2013): Telethon Network of Genetic Biobanks: a key service for diagnosis and research on rare diseases. Orphanet J Rare Dis **30**: 129.

Filocamo M., Morrone A. (2011): Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. Hum Genomics **5**: 156-69.

Fratantoni J.C., Hall C.W., Neufeld E.F. (1968): Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. Science **162**: 570-2.

Fumić K., Barić I., Mrsić M., Maradin M. (2004): Lizosomske bolesti nakupljanja - suvremena dijagnostika i nove metode liječenja. Paediatr Croat **48**: 160-8.

Gottweis H., Kaye J., Bignami F., Rial-Sebbag E., Lattanzi R., Macek M. (2012): Biobanks for Europe; European Commission, Directorate-General for Research and Innovation. Brussels, European Commission.

Grizzle W, Grody W.W., Noll W.W., Sobel M.E., Stass S.A., Trainer T., Travers H., Weedn V., Woodruff K. (1999): Recommended policies for uses of human tissue in research, education, and quality control. Ad Hoc Committee on Stored Tissue, College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med **123**: 296–300.

Gulbins H., Schrepfer S., Uhlig A., Goldemund A., Oberhoffer M., Reichenspurner H., Meiser B., Reichart B. (2002): Myoblasts survive intracardiac transfer and divide further after transplantation. Heart Surg Forum **5**: 340-4.

Haeckel E (1868): Natürliche Schöpfungsgeschichte, Georg Reimer, Berlin.

Hickman, S., Neufeld E.F. (1972): A hypothesis for I-cell disease: Defective hydrolases that do not enter lysosomes. Biochem Biophys Res Commun. **49**: 992–999.

Kassar-Duchossoy L., Gayraud-Morel B., Gomes D., Rocancourt D., Buckingham M., Shinin V., Tajbakhsh S. (2004): Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5: Myod double-mutant mice. Nature **431**: 466–471.

Kim G, Eom Y.W., Baik S.K., Shin Y, Lim YL, Kim M.Y., Kwon S.O., Chang S.J.,Yoo Z.S., Shin Y., Lim Y.L., Kim M.Y., Kwon S.O., Chang S.J. (2015): Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells for Patients with Chronic Liver Diseases: Systematic Review and Meta-analysis. J Korean Med Sci **30**: 1405-1415.

Kislinger T., Gramolini A.O., Pan Y., Rahman K., MacLennan D.H., Emili A. (2005): Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation. Mol Cell Proteomics **4**: 887-901.

Koene S., Smeitinik J. (2011): Mitochondrial medicine a clinical guideline, First edition. P. 135, Khondrion B.V., Nijmegen, The Netherlands.

Lipton B.H., E. Schultz. (1979): Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. Science **205**: 1292-1924.

Liu L., Yu Y., Hou Y., Chai J., Duan H., Chu W., Zhang H., Hu Q., Du J. (2014): Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. PloS ONE **9** : e88348.

Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X., Bourque G., George J., Leong B., Liu J., Wong K.Y., Sung K.W., Lee C.W., Zhao X.D., Chiu K.P., Lipovich L., Kuznetsov V.A., Robson P., Stanton L.W., Wei C.L., Ruan Y., Lim B., Ng H.H.

(2006): The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat Genet **38**: 431–440.

Magri F., Del Bo R., D'Angelo M.G., Govoni A., Ghezzi S., Gandossini S., Sciacco M., Ciscato P., Bordoni A., Tedeschi S., Fortunato F., Lucchini V., Cereda M., Corti S., Moggio M., Bresolin N., Comi GP. (2011): Clinical and molecular characterization of a cohort of patients with novel nucleotide alterations of the Dystrophin gene detected by direct sequencing. BMC Med Genet **12**: 37

Martin G.R., Evans M.J. (1974): The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. Cell **2**: 163-72.

Martinez A.M., Goulart C.O., Ramalho B.S., Oliveira J.T., Almeida F.M. (2014): Neurotrauma and mesenchymal stem cells treatment: from experimental studies to clinical trials. World J Stem Cells **6**: 179-194.

Mauro A. (1961): Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol **9**: 493–495.

Medawer P. (1960): Immunological Tolerance Scand J Immunol **33**: 337-344.

Meikle P.J., Hopwood J.J., Clague A.E., and Carey W.F. (1999): Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA **281**: 249 – 254.

Merkler M., Simić I., Pećin I., Muačević-Katanec D., Sucur N., Reiner Z. (2014): Gaucher disease-guidelines for diagnosis and management of adult patients. Lijec vjes **136** (5-6): 130-3.

Monaco L.,Crimi M., Wang C.M. (2014): The Challenge for a European Network of Biobanks for Rare Diseases Taken up by RD-Connect. Pathobiology **81**: 231–236.

Mora M., Angelini C., Bignami F., Bodin A.M., Crimi M., Di Donato J.H., Felice A., Jaeger C., Karcagi V., LeCam Y., Lynn S., Meznaric M., Moggio M., Monaco L., Politano L., de la Paz M.P., Saker S., Schneiderat P., Ensini M., Garavaglia B., Gurwitz D., Johnson D., Muntoni F., Puymirat J., Reza M., Voit T., Baldo C., Bricarelli F.D., Goldwurm S., Merla G., Pegoraro E., Renieri A., Zatloukal K., Filocamo M., Lochmüller H. (2015): The EuroBioBank Network: 10 years of hands-on experience of collaborative, transnational biobanking for rare diseases. Eur J Hum Genet **23**: 1116–1123.

Morrison S.J., Shah N.M., Anderson D.J. (1997): Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell **88:** 287–298.

Mummery C., Ward-van Oostwaard D., Doevendans P., Spijker R., van den Brink S., Hassink R., van der Heyden M., Opthof T., Pera M., de la Riviere A.B., Passier R., Tertoolen L. (2003): Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells, Circulation **107**: 2733–2740.

Munoz J., Shah N., Rezvani K., Hosing C., Bollard C.M., Oran B., Olson A., Popat U., Molldrem J., McNiece I.K., Shpall E.J. (2014): Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future. Stem Cells Transl Med **3**: 1435-1445.

Nacionalni plan i program za rijetke bolesti 2015-2020. godine, Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske.

O'Rourke B.(2010): From Bioblasts to Mitochondria: Ever Expanding Roles of Mitochondria in Cell Physiology. Front Physiol **1**: 7.

Peschanski M. (2008): Stem cells, time for scale-up. Med Sci **24**: 335-338.

Petković D., Barić I. (2005): Liječenje mukopolisaharidoza*:* Paed Croat **3***:* 49.

Riegman P.H., Morente M.M., Betsou F., de Blasio P., Geary P. (2008): Biobanking for better healthcare. Mol Oncol **2**: 213-22.

Rosenblatt J.D., Lunt A.I., Parry D.J., Partridge T.A. (1995): Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. In Vitro Cell Dev Biol Anim **31**: 773–779.

Rossi D.J., Jamieson C.H.M., Weissman I. L. (2008): Stems cells and the pathways to aging and cancer. Cell **132**: 681-696.

Salvaterra E., Lecchi L., Giovanelli S., Butti B., Bardella M.T., Bertazzi P.A., Bosari S., Coggi G., Coviello D.A., Lalatta F., Moggio M., Nosotti M., Zanella A., Rebulla P. (2008): Banking together. A unified model of informed consent for biobanking. EMBO Rep **9**: 307-13.

Scharner J., Zammit P.S. (2011): The muscle satellite cell at 50: the formative years. Skelet Muscle **1**: 28.

Schmitt S., Griensven M., Imhoff A.B., Buchmann S. (2012): Application of stem cells in orthopaedics. Stem Cells Int e394962.

Shi M., Z Zhang., Xu R., Lin H, Fu J., Zou Z., Zhang A, Shi J., Chen Lv S., He W., Geng H., Jin L., Liu Z.,Wang F.S. (2012): Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute-on-chronic liver failure patients. Stem Cells Transl Med **1**: 725-731.

Stern-Straeter J., Bran G., Riedel F., Sauter A., Hörmann K., Goessler UR.. (2008): Characterization of human myoblast cultures for tissue engineering. Int J Mol Med **21**: 49-56.

Stevens L.C., Little C.C. (1954): Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. Proc Natl Acad Sci (USA) **40**: 1080-7.

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

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

Till J.E., McCulloch E.A. (1980): Hemopoietic stem cell differentiation. Biochim Biophys Acta **605**: 431–459.

Trouet C. (2004): New European guidelines for the use of stored human biological materials in biomedical research. J Med Ethics **30**: 99–103.

UK STEM CELL BANK 2010: Code of Practice for the Use of Human Stem Cell Lines.

Vos M., Lauwers E., Verstreken P. (2010): Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. Front. Synaptic Neurosci **139**: 1-10.

Zammit P.S., Partridge T.A., Yablonka-Reuveni Z. (2006): The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. J Histochem Cytochem **54**: 1177-91.

Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U. (2005): Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol **11**: 1402–1416.

Weissman I.L. (2000): Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell **100**: 157-168.

WMA. (2002): World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. www.wma.net.

www.eurordis.org

www.eurostemcell.org

www.learn.genetics.utah.edu

www.sheffieldchildrens.nhs.uk

www.systemsbiology.org.au

Yuille M., Dixon K., Platt A., Pullum S., Lewis D., Hall A., Ollier W. (2010): The UK DNA banking network: a "fair access" biobank. Cell Tissue Bank **11**: 241-251.

Yuille M, van Ommen GJ, Bréchot C, Cambon-Thomsen A, Dagher G, Landegren U, Litton JE, Pasterk M, Peltonen L, Taussig M, Wichmann HE, Zatloukal K. (2008): Biobanking for Europe. Brief Bioinform **9**: 14–24.

Prilog 1.
Metaboličke bolesti i međunarodna klasifikacija ICD-10

Poremećaj metabolizma proteina, ugljikohidrata i lipida E70-E79
1.1. (E70-E72) – Aminokiseline
E70 Poremećaji metabolizma aromatskih aminokiselina
E70.0 Klasična fenilketonurija
E70.1 Ostale hiperfenilalaninemije
E70.2 Poremećaji metabolizma tirozina
E70.3 Albinizam
E70.8 Ostali poremećaji metabolizma aromatskih aminokiselina
E70.9 Poremećaj metabolizma aromatskih aminokiselina, nespecificiran

E71 Poremećaji metabolizma lančano vezanih aminokiselina i metabolizma masnih kiselina
E71.0 Bolest s mokraćom poput javorova sirupa
E71.1 Ostali poremećaji metabolizma lančano vezanih aminokiselina
E71.2 Poremećaj metabolizma lančano vezanih aminokiselina, nespecificiran
E71.3 Poremećaji metabolizma masnih kiselina
E72 Ostali poremećaji metabolizma aminokiselina
E72.0 Poremećaji prijenosa aminokiselina
E72.1 Poremećaji metabolizma aminokiselina koje sadrže sumpor
E72.2 Poremećaji metabolizma ciklusa ureje
E72.3 Poremećaji metabolizma lizina i hidroksilizina
E72.4 Poremećaji metabolizma ornitina
E72.5 Poremećaji metabolizma glicina
E72.8 Ostali specificirani poremećaji metabolizma aminokiselina
E72.9 Poremećaj metabolizma aminokiselina, nespecificiran

1.2. (E73-E74) – Ugljikohidrati
E73 Intolerancija laktoze
E73.0 Prirođeni manjak laktoze
E73.1 Sekundarni manjak laktoze
E73.8 Druga intolerancija laktoze
E73.9 Intolerancija laktoze, nespecificirana
E74 Drugi poremećaji metabolizma ugljikohidrata
E74.0 Bolest nagomilavanja glikogena
E74.1 Poremećaji metabolizma fruktoze
E74.2 Poremećaji metabolizma galaktoze
E74.3 Ostali poremećaji crijevne apsorpcije ugljikohidrata
E74.4 Poremećaji metabolizma piruvata i glukoneogeneze
E74.8 Drugi specificirani poremećaji metabolizma ugljikohidrata
E74.9 Poremećaj metabolizma ugljikohidrata, nespecificiran

1.3. (E75) – Lipidi
E75 Poremećaji metabolizma sfingolipida i ostali poremećaji nakupljanja lipida
E75.0 GM2 gangliozidoza
E75.1 Ostale gangliozidoze
E75.2 Ostale sfingolipidoze
E75.3 Sfingolipidoza, nespecificirana

E75.4 Neuronalna ceroidna lipofuscinoza
E75.5 Ostali poremećaji pohranjivanja lipida
E75.6 Poremećaj pohranjivanja lipida, nespecificiran

1.4. (E76-E78) – Mješoviti poremećaji

E76 Poremećaji metabolizma glikozaminoglikana
E76.0 Mukopolisaharidoza, tip I
E76.1 Mukopolisaharidoza, tip II
E76.2 Ostale mukopolisaharidoze
E76.3 Mukopolisaharidoza, nespecificirana
E76.8 Ostali poremećaji metabolizma glukozaminoglikana
E76.9 Poremećaj metabolizma glukozaminoglikana, nespecificiran

E77 Poremećaji metabolizma glikoproteina
E77.0 Defekti u posttranslacijskoj modifikaciji lizosomskih enzima
E77.1 Defekti u razgradnji glikoproteina
E77.8 Ostali poremećaji metabolizma glikoproteina
E77.9 Poremećaj metabolizma glikoproteina, nespecificiran

E78 Poremećaji metabolizma lipoproteina i ostale lipidemije
E78.0 Hiperkolesterolemija
E78.1 Hipergliceridemija
E78.2 Mješovita hiperlipidemija
E78.3 Hiperhilomikronemija
E78.4 Druga hiperlipidemija
E78.5 Hiperlipidemija, nespecificirana
E78.6 Manjak lipoproteina
E78.8 Ostali poremećaji metabolizma lipoproteina
E78.9 Poremećaj metabolizma lipoproteina, nespecificiran

Prilog 2.
Primjer informiranog pristanka pacijenta za biopsiju mišića na KBC Zagreb

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB
KLINIKA ZA PEDIJATRIJU
Zavod za neuropedijatriju
Zagreb – Rebro, Kišpatićeva 12

OBAVIJEST PACIJENTA O DIJAGNOSTIČKOM ODNOSNO TERAPIJSKOM POSTUPKU

PREDMET: Objašnjenje i pismeni pristanak roditelja/skrbnika pacijenta za izvođenje biopsije mišića.

SADRŽAJ OBAVIJESTI:
Vaše dijete je pacijent Zavoda za dječju neurologiju Klinike za pedijatriju KBC Zagreb. Tijekom liječenja postavljena je sumnja na bolest neuromuskularnog sustava.
Biopsija mišića je dijagnostički postupak u kojem se uzima komadić mišića u svrhu dijagnostičke obrade.
Molimo Vas za suglasnost za izvođenje ove dijagnostičke pretrage kod Vašeg djeteta koja je neophodna u njegovom daljnjem liječenju jer će nam pomoći da odredimo dijagnozu i preporučimo odgovarajuću terapiju.
Postupak biopsije mišića se izvodi u lokalnoj ili općoj anesteziji prema prosudbi liječnika.
Dobiveni komadići mišića, u svrhu dokazivanja bolesti neuromuskularnog sustava, mogu se analizirati na različite načine, bilo pripravljanjem za pregled pod mikrokopom, kao materijal za biokemijske analize dobiveni uzorak se pohrani u posebne, za to pripremljene tekućine i dalje se prosljeđuje u odgovarajuće laboratorije. Da se izbjegne bol pacijent prije izvođenja pretrage dobije analgetik.

EVENTUALNI RIZICI: Nuspojave navedenog postupka su minimalne i rijetke. Vezane su uz samo mjesto biopsije, uključuju bol i krvarenje iz kirurškog reza, a rijetko infekcije rane ili njeno usporeno zacjeljivanje. Na mjestu biopsije zaostaje manji ožiljak.

MOGUĆNOST ZAMJENE ZA PREPORUČENI POSTUPAK: Nema moguće zamjene za dobivanje biološkog materijala kao što je uzorak mišića za postupak kojem će Vaše dijete biti podvrgnuto.

IZJAVA RODITELJA/SKRBNIKA PACIJENTA/PACIJENTA-DJETETA:

Liječnik me upoznao sa zdravstvenim stanjem mog djeteta, preporučenim postupkom liječenja i eventualnim rizicima, uključujući i rizike koji su specifični za njegovo zdravstveno stanje, a isto tako i na rizike koji se u navedenoj situaciji najčešće pojavljuju.

Izjavljujem da sam bio/la u mogućnosti postavljati pitanja i savjetovati se s liječnikom glede zdravstvenog stanja mog djeteta, navedenog postupka, eventualnih rizika liječenja, a isto tako i o mogućnostima zamjene za preporučeni postupak i posljedicama njegovog odbijanja. Moja pitanja i nedoumice vezane uz navedeni postupak objašnjene su mi na zadovoljavajući i razumljiv način, te:

- ☐ **pristajem** na gore opisani postupak.
- ☐ svjesno **ne pristajem** na gore opisani postupak.

Suglasnost maloljetnika ≥16 godina: Potpis roditelja/skrbnika:

....

Datum: Liječnik:

....

Prilog 3.
Primjer informiranog pristanka pacijenta u EU

Information letter

Dear Mr./Ms. [write name and surname]

If you agree, your samples collected during [diagnostic or therapeutic interventions; research study] will be kept at the Italian Biobank, a public biobank that provides services relating to the collection, storage, characterisation, use and distribution of biological specimens inside the university hospital "Fondazione IRCSS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena".

Your samples will be used for the specific purposes of this study [describe the area, type and purposes of the specified study] and for all kinds of research that, directly or indirectly, relate to those purposes [describe in general the field and type of associated secondary uses].

As these studies will be performed using samples that have already been taken [during the course of your treatment, for biopsy evaluation, etc.], you will not be exposed to any physical risk associated with sample collection.

Your samples, and the data and information obtained about you, including the results of the research, will be treated confidentially and [specify coded, encrypted, kept under lock and key, etc.].

The results obtained on the basis of the research studies may contribute to the development of scientific publications or teaching material, as well as to the development of commercial products from which you will receive no financial benefit.

You are free to withdraw from the studies at any time and without giving a reason. If you withdraw, you can ask for your samples and data to be destroyed or made irreversibly anonymous.

Consent form

In the light of the information that I have received, and having had the opportunity to ask questions that have been answered, I agree to participate in these research studies and consent to the following:

- The samples collected during [specify] may be kept at the Italian Biobank of the Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena ☐ YES ☐ NO
- The samples and associated data may be used for the specific purposes of this study [specify: area, type and purposes of the specified study] ☐ YES ☐ NO
- The samples and associated data may be used for all kinds of researches that, directly or indirectly, relate to the specific purposes of this study [describe in general field and type of associated secondary uses] ☐ YES ☐ NO
- The samples, data and study results may be used by researchers for scientific publications and for educational purposes ☐ YES ☐ NO
- The samples, data and study results may be used by researchers for the development of commercial products, without any financial benefit to myself ☐ YES ☐ NO

I declare:

- I have been informed of my right to withdraw my consent to the storage and/or use of samples and associated data at any time and without giving any reason ☐ YES ☐ NO
- I have been informed that I will be given information from the research team concerning the progress and general results of the research studies upon my explicit request. I have also been informed that they will not communicate any individual results to me. ☐ YES ☐ NO

Date _____ Time _____

The present consent form was collected by:

Name and surname of patient/donor _____

Name and surname of physician/researcher _____

Signature _____

Signature _____

ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Marija Zekušić (rođ. Stojić)



Kruge 7, Zagreb

+385 123 677 244. +385 95 90 92 860

zekusicm@yahoo.com

Datum rođenja 24.02.1970.

Nacionalnost Hrvatica

RADNO ISKUSTVO

2008 - Sada

Biolog (analitičar)

Odjel za dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti,
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički cenetar Zagreb

- kvantitativna analiza aminokiselina metodom tandemske spektrometrije masa
- razvoj anlitičkih metoda, validacija i akreditacija metoda na masenom spektrofotometru
- akreditacija za medicinske laboratorije ISO 15 189
- evidencija popravnih i preventivnih radnji te analiza nesukladnosti
- uzgoj humanih stanica in vitro (keratinociti, fibroblasti, mioblasti)

2005 - 2007

Istraživač na projektu "Sistemska skleroza"

University of Naples Frederico II, University Hospital
Department of Surgery ,Via Pansini 5, Naples, Italy

- kultivacija stanica kože in vitro kod pacijenata sa sistemskom sklerozom

2004 - 2005

Biolog

Laboratorij za kulturu tkiva, Klinika za traumatologiju, Draškovićeva 19, Zagreb

- kultivacija kožnih presadaka za kliničku primjenu i organizacija novog laboratorija
- rad u sterilnim uvjetima pridržavajući se GLP/GMP

2000 - 2003

Stručni suradnik na projektu " Uzgoj ljudske kože in vitro "

Instutut "Ruđer Bošković", Zavoda za molekularnu medicinu,
Bijenička cesta 45, Zagreb

- uspostava sterilnih primarnih i sekundarnih kultura tkiva ljudske kože

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2010 - 2012

Doktor bioloških znanosti (PhD Biology), Molekularna biologijia i biokemija

Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek
"Probir 32 mutacije kapilarnom elektroforezom u pacijenata sa cističnom fibrozom u Hrvatskoj"
Izrađen na KBC Zagreb, Klinički zavoda za laboratorijsku dijagnostiku".

2003 - 2007

Magistar bioloških znanosti (Msc Biology), Fiziologija i imunobiologija

Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek
"Uzgoj ljudskog epidermalnog tkiva u kulturi za kliničku primjenu"
Izrađen na Istitutu "Ruđer Bošković", Zagreb

1992 – 1997

Magistar edukacije biologije

Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, Biološki odsjek
"Organotipična kultura ljudskog tkiva" Izrađen na Istitutu Ruđer Bošković , Zagreb

Stručno usavršavanje

Međunarodna znanstvena edukacija u trajanju od mjesec dana
Kvantitativna analiza aminokiselina na LC-MS/MS
ULB - Laboratoire de Pediatrie, Bruxelles, Belgija, 2013

Međunarodna znanstvena edukacija u trajanju od mjesec dana
Klinička primjena epidermalnih presadaka
Sveučilišna klinika, Biobanka u Bratislavi, Slovačka, 2002

OSOBNE VJEŠTINE I KOMPETENCIJE

Materinji jezik: Hrvatski

Drugi jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	B	B	B	B	B
Talijanski	B	B	B	B	B

Levels: A1/2: Basic user - B1/2: Independent user - C1/2 Proficient user
Common European Framework of Reference for Languages

Komunikacijske vještine i druge vještine

- dobre komunikacijske vještine, entuzijazam
- upravljanje kontrolom kvalitete (odgovorna za popravne, preventivne radnje i nesukladnosti)

Računalne vještine i kompetencije

- Microsoft Office™ tools i drugo

Socijalne vještine i kompetencije

- sposobna raditi samostalno kao i u timu

Umjetničke vještine

- crtanje

Vozačka dozvola

- B

DODATNE INFORMACIJE

Seminari

- Clinical Trials & Good Clinical Practice“, Pfizer (GCP), 2006
- Targeting the science within wounds“ NACME, 2006
- Ustrojstvo ispitnih i umjernih laboratorija prema HRN EN *ISO*/IEC 17025:2007, HAA, 2008
- ISO 9001:2008 tranzicija sa ISO 9001:2000” Qualitas, 2009
- Traceability and uncertainty of measurement, Zagreb, 2009
- Accreditation for beginners, how to implement ISO 15189” Zagreb, 2011
- Shimadzu training course: Hardware, Software, maintenance and troubleshooting, 2013
- Development and validation of Quantitative LC-MS/MS Assays for Use in Clinical Diagnostics, 2014

Članstva u društvu / udrugama

- Hrvatski liječnički zbor
- Hrvatsko društvo za rijetke bolesti
- Hrvatsko društvo za humanu genetiku
- Hrvatsko društvo biologa u zdravstvu