

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivona Arić

**Kontrola kvalitete stanične terapije
autolognim keratinocitima kod
zacjeljivanja teških opekлина**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Odjelu Banke tkiva i stanica i na Odjelu kontrole kvalitete u transfuziji, staničnoj i tkivnoj terapiji, Zavoda za transfuzijsku i regenerativnu medicinu, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, pod voditeljstvom dr. sc. Marije Zekušić, mag. biol. mol., te neposrednim voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Inge Urlič. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ZAHVALE:

Iskreno zahvaljujem mojoj cijenjenoj mentorici dr.sc. Mariji Zekušić, mag. biol. mol. na stručnom vodstvu i suradnji, predloženoj temi, iskazanom razumijevanju, ljubaznosti, spremnosti, strpljenju i pomoći tijekom pisanja diplomskog rada.

Hvala suvoditeljici izv. prof. dr. sc. Ingi Urlić na stručnom vodstvu i vrijednim savjetima.

Zahvaljujem svim djelatnicima Odjela Banke tkiva i stanica i Odjela kontrole kvalitete u transfuziji, staničnoj i tkivnoj terapiji Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice na ljubaznosti i pristupačnosti.

Zahvaljujem dr. sc. Snježani Ramić, mag. biol. mol. iz Klinike za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice na susretljivosti i izdvojenom vremenu.

Također, zahvaljujem dr. sc. Kreši Bendelji, mag. biol. mol. iz Laboratorija za imunologiju, Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu za nova znanja.

Posebno hvala mojoj divnoj obitelji, roditeljima Nedjeljki i Zvonku i sestri Elizabet, što su mi omogućili da studiram ono što volim i što su se pobrinuli da mi nikada ništa ne nedostaje, hvala Vam za neizmjerne strpljenje, podršku i bodrenje tijekom cijelog školovanja. Veliko hvala mojem Luki na razumijevanju i neprestanoj podršci. Hvala svim prijateljima, a posebno Sari, jer su uljepšali i olakšali sve trenutke studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

Kontrola kvalitete stanične terapije autolognim keratinocitima kod zacjeljivanja teških opekline

Ivona Arić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lijekovi za naprednu terapiju (engl. *Advanced Therapy Medicinal Products, ATMP*) pomažu pri liječenju opekline i rana koje teško zacjeljuju. U Banci tkiva i stanica u Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice uzgaja se i klinički primjenjuje autologna suspenzija keratinocita. Duboke dermalne opekline (II B°) i subdermalne opekline (III°) nemaju sposobnost spontanog zacjeljivanja zbog nedostataka keratinocitnih matičnih stanica. Nakon biopsije kože, enzimatskom digestijom se odvaja epidermis od dermisa, a zatim se izoliraju pojedinačni keratinociti i zasijavaju na 3T3 stanice tretirane mitomicinom C koje služe kao hranjiva podloga. Keratinociti se uzgajaju u plastičnim bočicama u mediju koji je obogaćen serumom i faktorima rasta. Klinički se primjenjuju u šprici sa dvokomponentnim fibrinskim ljepilom. Neophodna je kontrola kvalitete tijekom uzgoja koja podrazumijeva provjeru ukupnog broja keratinocita, postotak vijabilnih stanica i klonogeničnosti (holokon, meroklon, paraklon). Udio ostalih 3T3 stanica u suspenziji određuje se metodom protočne citometrije. U staničnoj terapiji se imunocitokemijskim metodama provjerava prisutnost epitelnih stanica bazalnog porijekla (CK14) te matičnih (p63), proliferacijskih (Ki-67) i diferenciranih (CK19) stanica. Mikrobiološkim kontrolama se dokazuje sterilnost svih staničnih medija te se mjeri koncentracija bakterijskih endotoksina i provjerava odsutnost *Mycoplasma* spp. Kontrola kvalitete osigurava efikasnu i sigurnu primjenu autolognih keratinocita kao ATMP.

(44 stranica, 22 slika, 10 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: tkivno inženjerstvo, lijek za napredne terapije, matične stanice, opekline

Voditelj: Dr. sc. Marija Zekušić, mag. biol. mol.

Suvoditelj: Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 17. veljače 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
Master Thesis

Quality control of cell therapy with autologous keratinocytes for severe burn wound healing

Ivona Arić

Rooseveltovtrg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Advanced therapy medicinal products (ATMPs) help treat burns and wounds that are difficult to heal. An autologous keratinocyte suspension is cultivated at the Tissue and Cell Bank in Sestre milosrdnice University Hospital Center. Deep dermal burns (II B°) and subdermal burns (III°) do not have the ability to heal spontaneously due to keratinocyte stem cell deficiencies. After skin biopsy, enzymatic digestion separates the epidermis from the dermis and then individual keratinocytes are isolated and seeded onto mitomycin C treated 3T3 cells used as a nutrient medium. Keratinocytes are cultivated in flasks in a serum and growth factors enriched medium. Clinically, they are applied by a syringe using fibrin glue. A quality control during cultivation is necessary and it includes keratinocyte number count, viable cells percentage and clonogenicity (holoclon, meroclone, paraclone). A number of the rest of 3T3 cells in the suspension is determined using flow cytometry. In the cell therapy, immunocytochemic methods are used for determining the presence of basal epithelial cells (CK14) and stem (p63), proliferation (Ki-67) and differential (CK19) cells. Microbiological controls prove the sterility of all cell mediums as well as measure the concentration of bacterial endotoxins and check for *Mycoplasma* spp. absence. Quality control ensures efficient and safe autologous keratinocytes usage as ATMP.

(44 pages, 22 figures, 10 tables, 53 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: tissue engineering, advanced therapy, stem cells, burns

Supervisor: Marija Zekušić, PhD

Co-supervisor: Dr. Inga Urlič, Assoc. Prof.

Reviewers:

Dr. Inga Urlič, Assoc. Prof.

Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Sc. Sofia Ana Blažević, Ass. Prof.

Thesis accepted: 17th February, 2021.

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Lijekovi za napredne terapije	1
1.1.1.	Genska terapija	1
1.1.2.	Terapija somatskim stanicama.....	2
1.1.3.	Tkivno inženjerstvo kao medicinski proizvod.....	2
1.2.	Osnovne informacije o ljudskoj koži.....	4
1.2.1.	Proliferacija i diferencijacija keratinocita.....	5
1.2.2.	Klonalnost keratinocita.....	6
1.3.	Klinička primjena uzgojenih keratinocita.....	7
1.3.1.	Transplantacija epidermalnih presađaka	8
1.3.2.	Transplantacija keratinocita u suspenziji.....	9
1.4.	Kontrola kvalitete	10
1.5.	Komercijalno dostupne zamjenske kože	10
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	12
3.	MATERIJALI I METODE.....	13
3.1.	MATERIJALI	13
3.1.1.	Reagensi	13
3.1.2.	Potrošni materijal.....	14
3.1.3.	Oprema	14
3.2.	METODE	15
3.2.1.	Priprema hranjivih medija	15

3.2.2.	Uzgoj stanica	17
3.2.3.	Određivanje ukupnog broja i vijabilnosti stanica	19
3.2.4.	Djelotvornost stvaranja kolonija.....	19
3.2.5.	Imunofenotipizacija protočnim citometrom	20
3.2.6.	Imunocitokemija.....	21
3.2.7.	Metoda određivanja endotoksina.....	23
3.2.8.	Detekcija prisutnosti <i>Mycoplasma</i> spp.	24
3.2.9.	Mikrobiološko uzorkovanje okoliša i hranjivog medija.....	24
4.	REZULTATI	26
4.1.	Rast 3T3 stanica u FM mediju.....	26
4.2.	Rast keratinocita na hranidbenoj podlozi od 3T3 stanica	26
4.3.	Test vijabilnosti stanica	29
4.4.	Djelotvornost stvaranja kolonija.....	30
4.5.	Rezultati imunofenotipizacije protočnim citometrom	32
4.6.	Rezultati imunocitokemijske analize.....	34
4.7.	Rezultati endotoksin testa.....	37
4.8.	Detekcija prisutnosti <i>Mycoplasma</i> spp.	38
4.9.	Rezultati mikrobiološke analize	38
5.	RASPRAVA.....	40
6.	ZAKLJUČCI:	44
7.	LITERATURA	45
	ŽIVOTOPIS	51

POPIS KRATICA

- ATMP – lijekovi za napredne terapije (engl. *advanced therapy medical product*)
- FDA - Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)
- EMA - Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*)
- CAT - Odbor za napredne terapije (engl. *The Committee for Advanced Therapies*)
- CHMP - Odbor za lijekove za primjenu kod ljudi (engl. *The Committee for Medicinal Products for Human Use*)
- GTMP – genska terapija (engl. *gene therapy medicinal product*)
- sCTMP - terapija somatskim stanicama (engl. *somatic cell therapy medicinal products*)
- TEP – lijek tkivnog inženjerstva (engl. *tissue engineered product*)
- GMP – dobra proizvođačka praksa (engl. *Good manufacturing practice*)
- GLP - dobre laboratorijske prakse (engl. *Good Laboratory Practice*)
- PD - udvostručenja populacije (engl. *population doubling*)
- CEA - kultiviranim autolognim transplantatima (engl. *cultured epidermal autograft*)
- ECM - ekstracelularni matriks (engl. *extracellular matrix*)
- CFE - djelotvornost stvaranja kolonija (engl. *Colony Forming Efficiency*)
- FBS - fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*)
- PBS – fosfatni pufer (engl. *phosphate buffered saline*)
- HAM – nutritivna mješavina (engl. *Nutrient mixture HAM's F-12*)
- GM – medij za uzgoj keratinocita (engl. *growth medium*)
- ATP – adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)
- cAMP - ciklički adenzin monofosfat (engl. *cyclic adenosine monophosphate*)
- EGF – epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*)
- CFE - djelotvornost stvaranja kolonija (engl. *colony forming efficiency*)
- HRP - enzim peroksidaza iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*)
- PTS – uređaja za mjerenje endotoksina (engl. *portable test system*)
- RT PCR - lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

1. UVOD

1.1. Lijekovi za napredne terapije

Prema Uredbi 1331/2004 lijek za napredne terapije (engl. *advanced therapy medicinal product*, ATMP) su brzorastuća inovativna terapija koja podrazumijeva gensku terapiju, terapiju somatskim stanicama i tkivno inženjerstvo te nudi nove mogućnosti liječenja. Nakon što farmaceutske tvrtke razviju ATMP, njegovu regulaciju, znanstvenu provjeru, nadzor, sigurnosti i djelotvornost provodi Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) unutar Europske unije, a u SAD-u Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) (Iglesias-López i sur. 2019). Ocjenjivanje ATMP-a zahtjeva specijalna stručna znanja te je iz tog razloga unutar EMA-e osnovan Odbor za napredne terapije (engl. *The Committee for Advanced Therapies*, CAT) koji je odgovoran za klasifikaciju i sastavljanje smjernica o kontroli kvalitete, sigurnosti i djelotvornosti pojedinog lijeka za napredne terapije. Odobrenje za primjenu u konačnici daje Odbor za lijekove za primjenu kod ljudi (engl. *The Committee for Medicinal Products for Human Use*, CHMP) uzimajući u obzir zakonske odredbe koje su trenutno na snazi, znanstvene činjenice i regulative Europske komisije. Zakonske regulative za odobrenje ATMP-a su vrlo stroge te je do danas odobren ograničen broj lijekova (Verbeken i sur. 2020).

1.1.1. Genska terapija

Lijekovima za gensku terapiju (engl. *gene therapy medicinal product*, GTMP) smatraju se lijekovi dobiveni pomoću seta proizvodnih postupaka koji se temelje na *in vivo* ili *ex vivo* transferu profilaktičkih, dijagnostičkih ili terapijskih gena (tj. dijela nukleinske kiseline). Manipulacija se odvija na ljudskim ili životinjskim stanicama čiji se geni naknadno ekspimiraju *in vivo*. Mehanizam transfera gena uključuje ekspresijski sustav sadržan u sustavu poznatom kao vektor, koji može biti virusnog i nevirusnog porijekla. Vektor također može biti i dio ljudske ili životinjske stanice (Direktiva 2003/63/EZ; Hanna i sur. 2016; Iglesias-López i sur. 2019). Prilikom manipulacija se također koriste plazmidne DNA, regulirajući oligonukleotidi, male interferirajuće RNA (siRNA) i lipidni kompleksi kako bi regulirali gensku ekspresiju kod određenih bolesti (Ma i sur. 2020). Genska terapija se primjenjuje kod ljudi kako bi se popravila, zamijenila, dodala ili izbrisala genetska sekvenca te tako povećala ili smanjila proizvodnja određenog proteina (Eder i Wild 2019; EDQM 2019).

1.1.2. Terapija somatskim stanicama

Lijek za terapiju somatskim stanicama (engl. *somatic cell therapy medical product*, sCTMP) podrazumijeva primjenu na ljudima autolognih ili alogernih živih somatskih stanica čije su biološke karakteristike značajno izmijenjene kao rezultat manipulacije. Cilj primjene terapije je ostvarivanje terapijskih, dijagnostičkih ili preventivnih učinaka pomoću metaboličkih, farmakoloških i imunoloških postupaka (Carvalho i sur. 2017; Direktiva 2003/63/EZ; Hanna i sur. 2016). Manipulacije podrazumijevaju uzgoj staničnih kultura i diferencijaciju ili aktivaciju pomoću faktora rasta te dovode do promjene temeljne funkcije stanica (Iglesias-López C. i sur., 2019). Svrha manipulacije je promjena imunoloških, metaboličkih ili ostalih funkcionalnih svojstava stanica (Direktiva 2003/63/EZ). Obzirom na primjenu, sCTMP terapije su namijenjene za hematološke poremećaje, probleme s kožom i mekim tkivima, ortopedske bolesti, onkološka i imunološka oboljenja, kardiovaskularne, neurološke i očne bolesti (Ramezankhani i sur. 2020).

1.1.3. Tkivno inženjerstvo kao medicinski proizvod

Prema Uredbi 1934/2007 lijek dobiven postupcima tkivnog inženjerstva (engl. *tissue engineered product*, TEP) podrazumijeva proizvod koji sadrži biotehnoški obrađene stanice ili tkiva ili je sastavljen od njih te se koristi kod ljudi ili se daje ljudima za regeneraciju, reparaciju ili nadomještanje ljudskog tkiva. Takva terapija se primjenjuje nakon promjene strukture i funkcije stanica ili tkiva kod primatelja u odnosu na darivatelja (Hanna i sur. 2016). Lijekovi tkivnog inženjerstva mogu sadržavati stanice, tkiva ljudskog i/ili životinjskog podrijetla, koje tijekom primjene terapije mogu biti žive ili nežive (Iglesias-López i sur. 2019). Proizvod također može sadržavati dodatne tvari kao što su stanični proizvodi, biomolekule, biomaterijali, kemijske tvari, nosači ili matrice (Uredba 1934/2007). Da bi se lijek klasificirao kao TEP podvrgava se opsežnim manipulacijama koje potiču proliferaciju i aktivaciju stanica uzgojenih u staničnoj kulturi te diferenciraju i stimuliraju s faktorima rasta (Ramezankhani i sur. 2020). Brojni znanstvenici diljem svijeta svoja istraživanja usmjeravaju na pronalazak odgovarajuće kombinacije stanica i nosača koji bi oblikom i funkcijom zamijenili ljudski organ te pomogli pri liječenju raznih bolesti. Takve terapije još uvijek imaju brojne nedostatke jer kompleksnu strukturu velikih organa čini mnoštvo različitih stanica koje se nalaze u različitim stadijima razvoja (Guimarães i sur. 2020).

1.1.3.1. Keratinociti kao lijek za napredne terapije

Krajem dvadesetog stoljeća je uspostavljena prva kultura epidermalnih keratinocita koja je od tada u kliničkoj uporabi za autologni tretman dubokih dermalnih opekline (II B°) i opekline trećeg stupnja (Barrandon i Green 1987; De Luca i sur. 2019). Autologni keratinociti uzgajani *in vitro* koji su bili predmet značajnih manipulacija kako bi im se promijenile biološke karakteristike, fiziološke funkcije ili strukturalna svojstva, a koriste se s ciljem regeneracije, popravljivanja ili zamjene ljudskog tkiva, smatraju se proizvodima tkivnog inženjerstva (EMA i CAT 2018). Kada prilikom ozljede kože nedostaju keratinocitne matične stanice, ne može doći do spontanog zarastanja tkiva te se moraju primijeniti ATMP terapije koje se izrađuju specifično za pojedinog pacijenta prema principu bolničkog izuzeća ili se primjenjuju komercijalno dostupne zamjenske kože (Verbeken i sur. 2020).

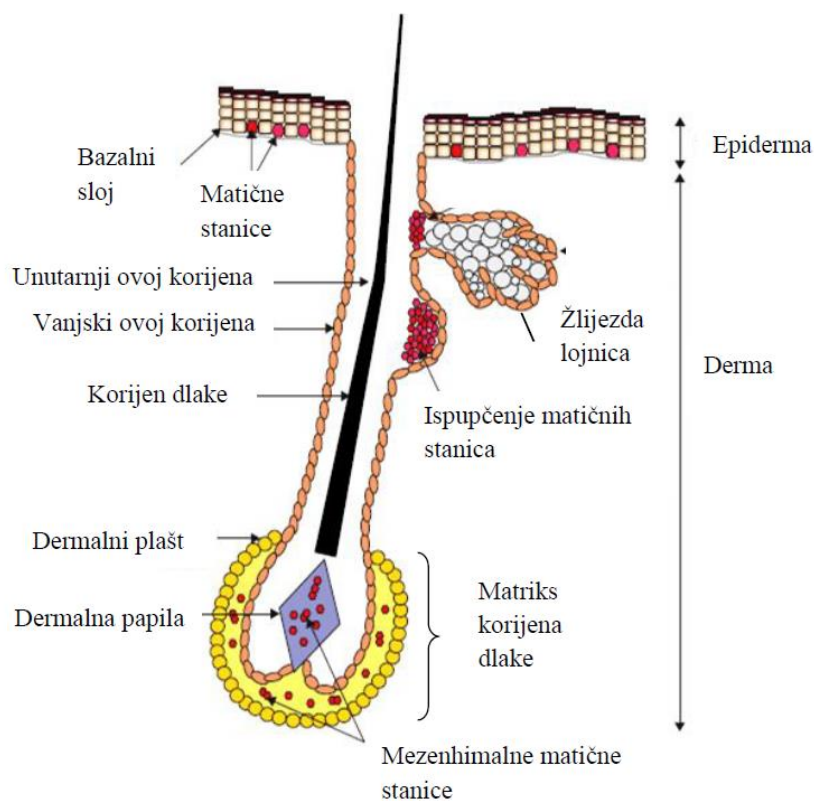
Oni ATMP-ovi koji se primjenjuju na osnovu bolničkog izuzeća ne smiju se pripremati na industrijski niti rutinski način te se moraju koristiti kao personalizirani proizvod za određenog pacijenta (Izješće komisije Europskog parlamenta i Vijeća). Bolničko izuzeće podrazumijeva proizvode koji nisu namijenjeni komercijalnoj proizvodnji u biotehnološkim ili farmaceutskim tvrtkama nego omogućava dostupnost lijekova na razini bolnice onim pacijentima koji su životno ugroženi (Eder i Wild 2019). Takve biološke proizvode koji su u kategoriji bolničkog izuzeća mora odobriti nadležno tijelo (Ministarstvo zdravstva) te se primjenjuju pod odgovornošću liječnika prema standardima dobre proizvođačke prakse (engl. *Good manufacturing practice*, GMP) i dobre laboratorijske prakse (engl. *Good Laboratory Practice*, GLP) (Verbeken i sur. 2020). Prvu staničnu kulturu keratinocita na letalno ozračenim 3T3 stanicama su uspostavili Rheinwald i Green te se ona i danas koristi kao ATMP proizvod u liječenju opekline i rana koje ne zarastaju (De Luca i sur. 2019).

Brojne biotehnološke i farmaceutske kompanije su prepoznale područje razvoja ATMP-a te ih proizvode u komercijalne svrhe (Verbeken i sur. 2020). Prvi komercijalni ATMP proizvod bio je ChondroCelect® (TiGenix, Leuven, Belgija) odobren 2009. godine u Europskoj uniji (EU) za liječenje oštećenja hrskavice (Hanna i sur. 2016). Holoclar® (TheChiesi Group/Parma i Holostem/Modena, Italija) je bila prva terapija limbalnim matičnim stanicama, a lijek Imlygic® (BioVex, SAD) je bio prva genska terapija za liječenje melanoma koju je odobrila EMA (Eder i Wild 2019). Nedostatak ATMP-a je vrlo visoka cijena te su mnogi

proizvodi nakon kratkotrajne uporabe povučeni s tržišta zbog neisplativosti (Iglesias-López i sur. 2019).

1.2. Osnovne informacije o ljudskoj koži

Ljudska koža se sastoji od epidermisa, dermisa i hipodermisa gdje epidermis od dermisa odvaja bazalna membrana (Akter i sur. 2016). Iz epidermalnih matičnih stanice, koje se nalaze u izbočenom dijelu folikula dlake (engl. *bulgearea of the hair follicle*), diobama nastaju keratinociti i migriraju u bazalni sloj epidermisa (Slika 1.) (Niezgoda i sur. 2017). Keratinociti čine 95% epidermisa uz melanocite, Langerhansove stanice i Merkelove stanice te zajedno čine mnogoslojni pločasti epitel koji ne sadrži krvne žile (McGrath i sur. 2004). Prilikom cijeljenja rana ključna je prisutnost matičnih stanica koje u slučaju ozljede povećavaju broj dioba kako bi nadomjestile izgubljene keratinocite procesom epitelizacije (Pastar i sur. 2014). Ukoliko je rana toliko duboka da nedostaju matične stanice, potrebno ih je ponovno aplicirati na ozlijeđeno područje pomoću autolognih ili alogenih kožnih transplantata (Li i Maitz 2018).



Slika 1. Prikaz strukture kože i smještaja keratinocitnih matičnih stanica (preuzeto i prilagođeno iz Niezgoda i sur. 2017).

Drugi sloj kože je dermis kojeg tvori gusto vezivno tkivo s brojnim kolagenima i elastičnim vlaknima, sadrži glatka mišićna vlakna, žlijezde znojnice i lojnice, krvne žile, folikule dlake i osjetilne stanice (Blair i sur. 2019). Najbrojnije stanice dermisa su fibroblasti koji sintetiziraju kolagen, elastin i duge proteine izvanstraničnog matriksa te enzime kolagenaze (Kim i sur. 2019). Dermis nema sposobnost samoobnavljanja te ranu zatvara fibroznim tkivom uslijed čega nastaje ožiljak, no primjenom ATMP keratinocita i dermalnih zamjena može doći do potpune regeneracije kožnog tkiva (ter Horst i sur. 2018). Obnova dermisa je ključna za vraćanje mehaničke čvrstoće koja poboljšava prijanjanje transplantiranog epidermisa (Ramezankhani i sur. 2020).

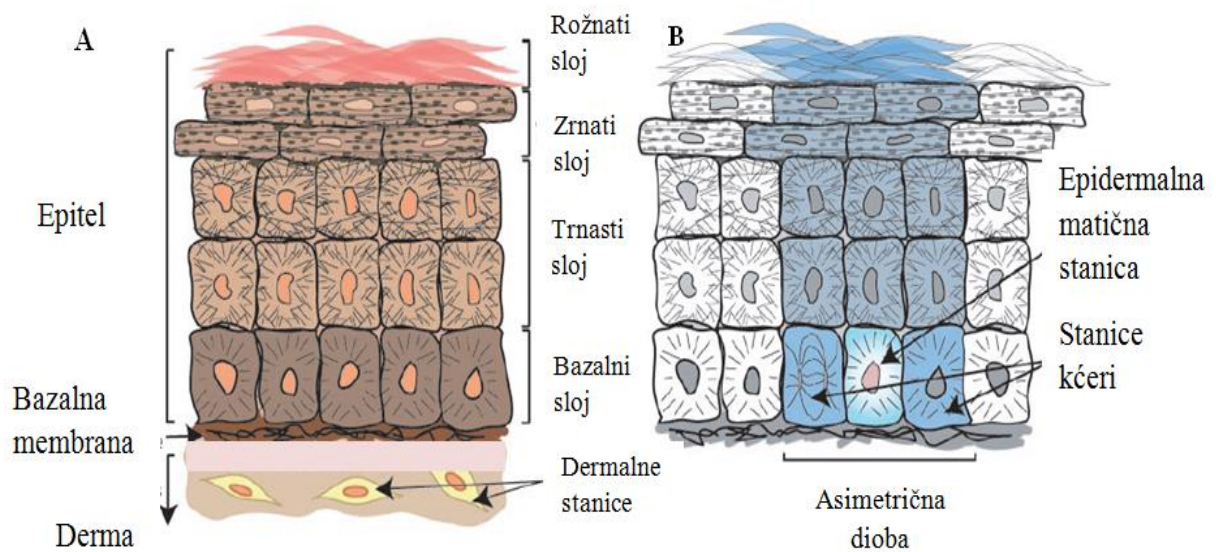
Hipodermis je treći sloj kože koji se nalazi ispod dermisa te pruža izolaciju i amortizaciju između kože i kosti i mišića (Vig i sur. 2017). Izgrađen je od adipocitnih stanica koje grade masno tkivo, kolagenskih vlakana koja čine vezivno tkivo i od krvnih žila. Donji sloj kože pruža toplinsku i mehaničku zaštitu te služi kao skladište energije (Dai i sur. 2020). Hipodermis sadrži zalihe progenitorskih stanica te ima ključnu ulogu u parakrinoj i endokrinoj signalizaciji prilikom liječenja opekline (Blair i sur. 2019).

1.2.1. Proliferacija i diferencijacija keratinocita

Keratinociti nastaju iz multipotentnih keratinocitnih matičnih stanica koje su smještene u ispupčenju folikula dlake te migriraju na bazalnu membranu gdje postaju unipotentne (Niezgoda i sur. 2017). Nakon proliferacije u bazalnom sloju epidermisa keratinociti diferenciraju i migriraju u rožnati sloj (Blair i sur. 2019; Pastar i sur. 2014). Keratinociti u bazalnom sloju su pričvršćeni na bazalnu membranu pomoću hemidezmosoma i fokalnih adhezija, a oni keratinociti koji se odvoje od bazalne membrane i stratificiraju međusobno se povezuju dezmosomima (Pastar i sur. 2014). Matične stanice imaju sposobnost samoobnavljanja jer se dijele asimetričnom diobom (Rousselle i sur. 2019). Od jedne matične stanice nastanu dvije pri čemu jedna stanica kćer zadržava svojstva matične stanice, a druga stanica kćer ulazi u proces diferencijacije i stratifikacije (Slika 2B) (Alonso i Fuchs 2003).

Ulaskom u trnasti sloj keratinociti učvršćuju strukturu citoskeleta i jačaju međustanične veze, zatim odlaze u zrnati sloj gdje stvaraju proteinska vlakna te pod utjecajem kalcijevih iona završno diferenciraju (Alonso i Fuchs 2003). Prilikom sazrijevanja keratinociti gube ribosome, mitohondrije, Golgijev aparat i endoplazmatski retikulum te im se mijenja oblik iz kuboidnog

u pločasti (Potten i Booth 2002). Dok migriraju kroz slojeve, keratinociti akumuliraju keratin te njihov životni vijek završava apoptozom. Na površini kože se nalazi mrtvi sloj stanica koje svakodnevno odbacujemo (Slika 2A) (McGrath i sur. 2004). Proliferacijski potencijal keratinocita se smanjuje starenjem kože, a migracija keratinocita od bazalnog do rožnatog sloja tijekom cijelog životnog vijeka ostaje nepromijenjena (Blair i sur. 2019).

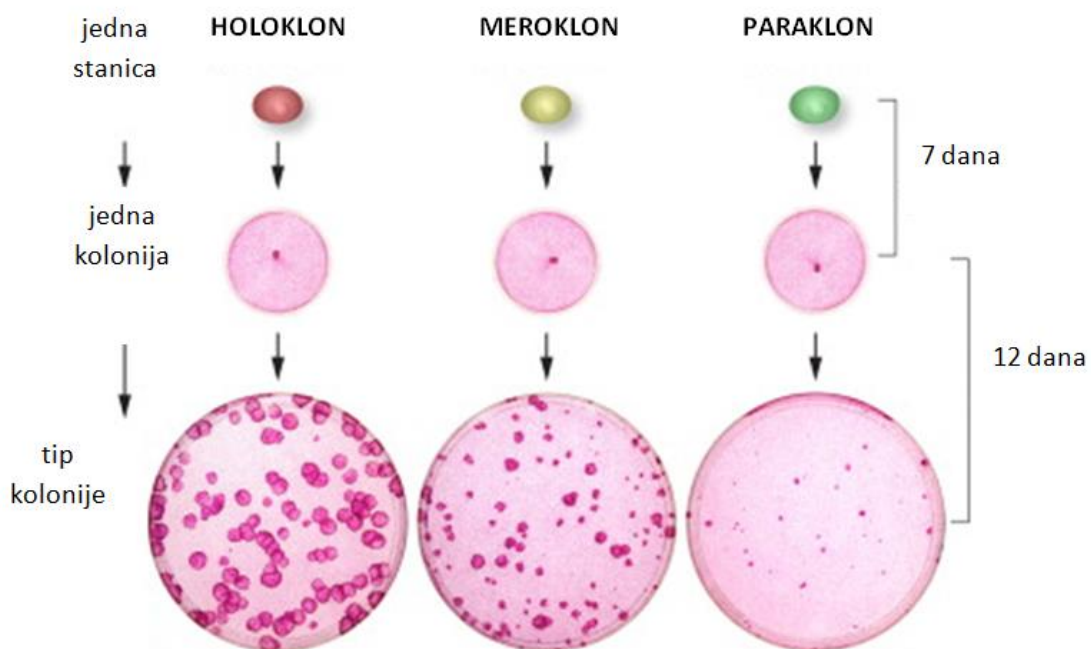


Slika 2. Prikaz nastanka i stratifikacije slojeva epitela (A) i asimetrične diobe epitelnih matičnih stanica koje obnavljaju epitel (B) (preuzeto i prilagođeno iz Alonso i Fuchs 2003).

1.2.2. Klonalnost keratinocita

Matične stanice humanih keratinocita su klonogene i mogu se uzgajati u staničnoj kulturi (Rheinwald i Green 1977). U kontroliranim uvjetima matične stanice, poznate kao holoklonovi, mogu ostvariti oko 180 udvostručenja populacije (engl. *population doubling*, PD) i na taj način obnavljaju epidermis jer stvaraju progresivno rastuće kolonije (Nanba i sur. 2013). Proliferativni potencijal stanica se procjenjuje izolacijom jedne stanice i promatranjem razvoja njenih kolonija. Klonskom analizom je utvrđena prisutnost meroklonova koji imaju ograničenu mogućnost rasta te tvore velike progresivno rastuće i terminalne kolonije.

Paraklonovi mogu ostvariti samo oko 15 PD i stvaraju samo terminalne kolonije. Holoklonovi se mogu u velikoj mjeri obnovljati *in vitro* i *in vivo*, a merokloni i parakloni se postupno gube nekoliko mjeseci nakon transplantacije autolognih presađaka kože (Slika 3) (Barrandon i sur. 2012; Barrandon i Green 1987; De Luca i sur. 2019; Nanba i sur. 2013). Na zatupljenost klonskih vrsta utječe starenje jer stanice podrijetlom iz epidermisa starijih darivatelja daju nizak udio holoklona i visok udio paraklona dok je kod mladih osoba situacija obrnuta (Barrandon i Green 1987). Uzgojem stanica u kulturi primijećena je klonska konverzija gdje holoklonovi prelaze u meroklonove i paraklonove zbog stresa ili neadekvatnih uvjeta kulture no inhibicijom mTOR signalnog puta dolazi do smanjenja nastanka paraklonova (Nanba i sur. 2013). Primjenom autolognih transplantata kože poželjan je što veći broj holoklonova tj. matičnih stanica koje imaju mogućnost samoobnavljanja i obnove tkiva (Hirsch i sur. 2017).



Slika 3. Prikaz klonske analize (preuzeto i prilagođeno iz Barrandon i sur. 2012).

1.3. Klinička primjena uzgojenih keratinocita

Kožne opekline mogu biti smrtonosne jer uzrokuju gubitak vode i topline, a otvorena rana omogućava ulazak brojnim patogenima koji uzrokuju razne upalne procese i sepsu (Jeschke i sur. 2018). Od prve uspostave kulture keratinocita do danas znanstvenici diljem svijeta tragaju za naprednim terapijama koje bi povećale stopu preživljenja nakon teških opekline te omogućile

kvalitetan život nakon primjene terapije (Verbeken i sur. 2020). Opekline se liječe kultiviranim autolognim transplantatima (engl. *cultured epidermal autograft*, CEA), kultiviranim alogenim transplantatima ili kadaveričnom kožom ukoliko je područje opekline preveliko za uzimanje biopata za autologni uzgoj kože (Vig i sur. 2017). Autologni mrežasti kožni transplantati se presađuje sa zdravog dijela tijela na opečeni ukoliko opekline zahvaćaju manju površinu kože. U slučaju dubokih dermalnih opekline (II B°) i subdermalnih opekline (III°) koje obuhvaćaju više od 20 - 30% kože primjenjuje se ATMP tj. kultura keratinocita za autologni tretman (EDQM 2019; Li i Maitz 2018). Cilj kliničke primjene keratinocita je obnova kože opečenog područja te ponovna vaskularizacija i epitalizacija radi neutralizacije hipoksije i acidoze rane i tkiva oko rane (Fredriksson i sur. 2008).

1.3.1. Transplantacija epidermalnih presađaka

Nakon biopsije kože enzimskom digestijom se odvaja epidermis od dermisa, keratinociti se razdvajaju u suspenziju i zasijavaju na letalno ozračene ili mitomicinom C tretirane mišje fibroblaste (3T3 stanice) koji služe keratinocitima kao hranjiva podloga. Uzgoj epidermalnih presađaka najčešće traje tri do četiri tjedna ovisno o stupnju opekline, zdravstvenom stanju pacijenta i njegovoj dobi. Epidermalni presađci su vrlo krhki jer se sastoje od samo 8-10 slojeva stanica (Fredriksson i sur. 2008). Nakon uzgoja keratinociti se prenose na vazelinsku gazu i klinički primjenjuju (Jeschke i sur. 2018; Li i Maitz 2018).

Pacijenti s dubokim dermalnim opeklinama (II B°) i subdermalnim opeklinama (III°) tretiraju se kirurški jer uklanjanje nekrotičnog tkiva i primjena epidermalnih presađaka poboljšava ishod liječenja, skraćuje boravak u bolnici i ubrzava oporavak bolesnika. Nakon izrezivanja nekrotične kože, rana se može prekriti prethodno uzgojenim alogenim transplantatima ili kadaveričnom kožom, ovisno o metodi koja je validirana u određenoj banci tkiva i dobivenoj licenci. Prekrivanje rane sa uzgojenim autolognim keratinocitima je ključno jer sprječava ulazak patogena i izlazak topline te ne izaziva imunološku reakciju (Hettiaratchy i Dziewulski 2004; Klama-Baryła i sur. 2018). Nakon kirurške adaptacije autolognih epidermalnih presađaka dolazi do aktivacije keratinocita i porasta izlučivanja faktora rasta što rezultira reepitelizacijom rane od rubova prema unutrašnjosti (Kanapathy i sur. 2017). Primjenom autolognih epidermalnih transplantata ne postoji mogućnost odbacivanja kože, a područje na kojem je uzeta biopsija vrlo brzo zaraste (Rousselle i sur. 2019). Glavni čimbenik za brzo i efikasno liječenje opekline je rana primjena terapije (Klama-Baryła i sur. 2018). Primjenom kultiviranih autolognih presađaka mogu se prekriti velike površine kože nakon male

biopsije, međutim nedostatak je dugo vrijeme uzgoja epidermalnih presađaka, zahtjevan transporta i pohrana (ter Horst i sur. 2018). Zabilježeni su zadovoljavajući rezultati liječenja opekline kada se CEA kombinira s acelularnim dermalnim nosačima (Currie i sur. 2001; EDQM 2019; Kanopathy i sur. 2017).

1.3.2. Transplantacija keratinocita u suspenziji

Nakon biopsije kože izoliraju se epidermalne stanice iz epidermisa pomoću jednog ili više enzima, a najčešće se upotrebljavaju 0,25% tripsin/EDTA ili dispaza II. Tripsin se koristi kao primarni enzim koji cijepa peptidne veze i razgrađuje proteine u manje peptide te stvara pojedinačne stanice, a dispaza II razgrađuje ekstracelularni matriks (engl. *extracellular matrix*, ECM) (EDQM 2019; Zhao i sur. 2016). Terapija je spremna za kliničku primjenu već sedam dana nakon uzimanja biopsije (ovisi o težini opekline i zahvaćenoj površini) što ima značajnu ulogu u brzini izlječenja, posebice kod male djece (Li i Maitz 2018). Za transplantaciju pomoću keratinocita u suspenziji se primjenjuju 70 - 80% konfluentne kulture stanica koje imaju sposobnost danjeg razmnožavanja nakon nanošenja na ranu (ter Horst i sur. 2018). Poslije tripsinizacije i brojanja, keratinociti u suspenziji se nanose pomoću dvokomponentnog fibrinskog ljepila, aerosolnim sprejevima i drugim komercijalnim uređajima (Fredriksson i sur. 2008). Nakon nanošenja stanica, rana se pokriva sterilnim zavojima kako bi se spriječio gubitak vode iz rane i zadržala tjelesna toplina te spriječio ulazak patogena (Esteban-Vives i sur. 2016).

Metoda pripreme keratinocita u suspenziji zahtjeva primjenu proteolitičkih enzima koji razgrađuju ECM i receptore stanične membrane. Keratinociti u suspenziji potiču brže cijeljenje rana, a priprema kulture stanica ne zahtjeva mnogo vremena. Transport i skladištenje su u odnosu na metodu CEA praktičniji jer se keratinociti u suspenziji mogu transportirati iz laboratorija do pacijenta u pripremljenim špricama (Fredriksson i sur. 2008). Miješanje suspenzije keratinocita s fibrinskim ljepilom pokazalo se vrlo efikasnom metodom jer osigurava pokretljivost keratinocita te brzu ponovnu epitelizaciju (Currie i sur. 2001). Uz liječenje opekline, suspenzija keratinocita se koristi u liječenju kroničnih rana koje nastaju kao posljedica dijabetesa, imunosupresivnih lijekova i raznih autoimunih bolesti, a također se primjenjuje za liječenja vitiliga (Zhao i sur. 2016).

1.4. Kontrola kvalitete

Prilikom prikupljanja, uzimanja, obrade, pohrane i raspodjele ljudskih stanica u bankama tkiva se provode testovi kontrole kvalitete zbog sigurnosti, kvalitete i djelotvornost ATMP-ova (Direktiva 2004/23/EZ; EDQM 2019). Gotovi reprezentativni uzorci i odgovarajući mediji u kojima se uzgajala kultura stanica šalju se na mikrobiološka ispitivanja radi provjere aerobnih i anaerobnih bakterija, plijesni i gljivica (Pirnay i sur. 2012). Posebno je ozbiljna infekcija mikoplazmama koje prirodno nastanjuju ljudski organizam jer nisu otporne na antibiotike te ih je potrebno detektirati pomoću PCR-a ukoliko su prisutne (Pamies i sur. 2017). Prilikom filtriranja medija mikoplazme mogu proći kroz filtere veličinom pora $\leq 0,2 \mu\text{m}$, a da pritom ne utječu na rast stanica i ne snižavaju pH (EDQM 2019). Za provjeru čistoće zraka u čistim sobama, kontaktnih površina te prstima i odjeći djelatnika uzorci se inkubiraju na agaru, a uzorak se proglašava negativnim ukoliko ne narastu kolonije bakterija, kvasca niti gljivica nakon 21 dana (Tognetti i sur. 2017). Također je potrebno provjeriti prisutnost bakterijskih endotoksina, te ukoliko nema endotoksina podrazumijeva se odsutnost pirogenih komponenata (Gálvez i sur. 2014). Banke tkiva provode validirane i standardizirane postupke koji osiguravaju ponovljivost i sigurnost u svim fazama obrade stanica i tkiva, na taj način izbjegavaju biološku kontaminaciju i dovode do poboljšanja kvalitete epidermalnih presađaka (Pamies i sur. 2017). Zbog visokog stupnja odgovornosti banke tkiva osiguravaju da sustav kvalitete poštuju standardne operativne postupke, međunarodne smjernice, stručne priručnike, obrasce za izvješća, registar darivatelja i podatke o krajnjem odredištu tkiva i stanica kako nebi došlo do bilo kakvih pogrešaka (Direktiva 2004/23/EZ).

1.5. Komercijalno dostupne zamjenske kože

Iako autologni i alogeni transplantati kože pokazuju dobre rezultate liječenja opekline, zbog nedostatka donorskog tkiva često se koristi komercijalno dostupna zamjenska koža (Chua i sur. 2016). Za izradu alternativne terapije koriste se biomaterijali izolirani iz samog pacijenta, od kadavera ili životinjskog podrijetla. Često se koriste sintetički polimeri koji osiguravaju lakše praćenje kemijskog sastava i mehaničkih svojstava, a mogu biti razgradivi i nerazgradivi (Sheikholeslam i sur. 2018). Ovisno o dubini opekline i vrsti slojeva koje je potrebno nadomjestiti postoje epidermalna, dermalna i dermo-epidermalna (kompozitna) zamjenska koža koja može biti autologna, alogena ili ksenogena (Dai i sur. 2020). Trenutno dostupne

zamjenske kože imaju nedostatak masnog tkiva, dlačica, žlijezda lojnica smanjen broj melanocita i brojne kontrakture što dovodi do problema s pokretljivošću i estetikom (Urciuolo i sur. 2019). Također uvijek postoji opasnost od infekcije, često je ograničena inervacija i cirkulacija pa je spriječen dovod topline i imunološka regulacija (Fariba i Akram 2017).

Najpoznatija komercijalna autologna koža izrađena od biomaterijala je EpiDex® (EuroDerm Biotech & Aesthetics, DE). Dobiva se kultivacijom keratinocita iz vanjske ovojnice korijena folikula dlake iz vlasišta te se koristi kao trajna zamjena epidermisa (Vig i sur. 2017). Dermagraft® (Advanced BioHealing, CA) je dermalna zamjena alogenog porijekla koja se sastoji od biorazgradivog poliglaktinskog nosača na koji se zasijavaju neonatalni fibroblasti koji se nakon primjene razmnožavaju i stvaraju faktore rasta i izvanstanični matriks (Fariba i Akram 2017). Najrjeđe se koriste kompozitne kožne zamjene ksenogenog podrijetla kao što je komercijalno dostupan proizvod Oasis® (Smith & Nephew, UK) izrađen od dijelova svinjske submukoze te također namijenjen liječenju opekline i kroničnih rana (Vig i sur. 2017).

Sintetska kožna tvorevina služi kao barijera koja sprječava ulazak mikroorganizama i izlazak vode iz tijela, a najpoznatiji proizvodi su Biobrane® (UDL Laboratories, IL), Integra® (Integra LifeSciences, NJ) i Alloderm™ (LifeCell, IN) (Vig i sur. 2017). Izrađene su od biorazgradivih materijala koji zadržavaju trodimenzionalnu strukturu dok ih ne prekriju epitelne stanice i fibroblasti, a krvne žile naprave novu mrežu žila (Akter i sur. 2016). Integra® se sastoji od dva sloja, donji sloj je dermalni i sastoji se od kolagena tipa I iz goveđe tetive i hondroitin-6-sulfata morskog psa, a gornji dio je epidermalni i sastoji se od silikona koji predstavlja pseudodermu (Dai i sur. 2020). Biobrane® čini tanki silikonski sloj koji prekriva najlonsku mrežu ispunjenu svinjskim kolagenom tipa I (Fariba i Akram 2017). Alloderm™ se dobiva iz kadaveričnog dermisa koja se decelularizira, te ima bazalnu membranu, ali nema epidermalni sloj pa iako je imunološki inertan postoji mogućnost prijenosa bolesti (Akter i sur. 2016). Zajednička karakteristika svih komercijalnih terapija je vrlo visoka cijena (Dai i sur. 2020).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je kontrola kvalitete keratinocita u suspenziji uzgojenih na hranjivoj podlozi od 3T3 stanica u sterilnim uvjetima kod liječenja dubokih dermalnih (II B°) i subdermalnih (III°) opekline.

Specifični ciljevi:

- 1) Odrediti indikatore kontrole kvalitete
 - a. odrediti djelotvornost stvaranja kolonija (engl. *Colony Forming Efficiency*, CFE)
 - b. odrediti vijabilnost keratinocita
 - c. utvrditi postotak ostalih mišjih 3T3 stanica
 - d. odrediti količinu bakterijskih endotoksina u staničnoj kulturi
 - e. dokazati odsutnost *Mycoplasma* spp.
 - f. provjeriti mikrobiološku sterilnost hranjivih medija u staničnim kulturama
 - g. utvrditi biljeg epitelnih stanica bazalnog porijekla (CK14), biljeg zrelih diferenciranih keratinocita (CK19), biljeg matičnih stanica (p63) i proliferacijski biljeg (Ki-67).

3. MATERIJALI I METODE

U istraživanju sam koristila keratinocite pacijenta (1967.) za autologni tretman dubokih dermalnih opekline (II B°) leđa koje je zadobio nakon pada u vrelu vodu. Zaleđene keratinocite sam dobila iz Banke tkiva i stanica u Klinici za traumatologiju, KBC Sestre milosrdnice. Eksperiment je proveden u skladu sa GMP, GLP. U Laboratoriju za kontrolu kvalitete, istraživanje i razvoj sam provela testove kontrole kvalitete radi sigurnosti i efikasnosti primjene stanične terapije. U informiranom pristanku pacijenta dobila sam suglasnost za uzimanje uzoraka za klinički primjenu i za istraživanje.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Reagensi

- DMEM medij s visokom koncentracijom glukoze (4500 mg/L) i Ca^{2+} (engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Sigma, SAD) (+ 4 °C)
- FM hranjivi medij (engl. *fibroblast medium*) (+ 4 °C)
- GM hranjivi medij (engl. *growth medium*) (+ 4 °C)
- L-glutamin (200 mM) (- 20 °C)
- FBS fetalni goveđi serum (engl. *fetal bovine serum*) (Life Technologies, SAD) (- 20 °C)
- DPBS - CMF, Dulbekov fosfatni pufer bez Ca^{+2} i Mg^{+2} (engl. *Dulbecco's phosphate buffer saline calcium and magnesium free*) (Sigma, SAD) (Sobna temperatura)
- HAM (engl. *Nutrient mixture HAM's F-12*) (Life Technologies, SAD) (+ 4 °C)
- Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin/1mM EDTA) (Life Technologies, SAD) (- 20 °C)
- ABAM 5000 IJ. (Antibiotic /Antymicotic solution) (Sigma, SAD) (- 20 °C)
- Dispaza (0,77 U/mg) (Life Technologies, SAD) (+ 4 °C)
- Mitomicin C (Sigma, SAD) (+ 4 °C)
- DMSO (engl. Dimethyl sulfoxide) (Alchimia, Italija) (- 20 °C)
- EnVision FLEX citratni pufer 7,2 pH (Dako, Danska) (2 - 8°C)

3.1.2. Potrošni materijal

Plastični pribor koji sam koristila bio je jednokratni. Sva pakiranja su bila odgovarajuće obilježena (serijski broj, sterilnost, kataloški broj, vrsta materijala, rok trajanja i namjena). Nakon korištenja sav materijal je ispravno zbrinut.

Kao potrošni materijal koristila sam:

- Sterilne pipete kapaciteta 5 mL i 10 mL (Sarstedt, Njemačka)
- Jednokratni sterilni nastavci za automatske pipete (Eppendorf, Njemačka)
- Sterilne epruvete za centrifugiranje od 12 mL i 50 mL (Sarstedt, Njemačka)
- Sterilne Petrijeve posude za uzgoj kultura stanica od 100 mm² (Sarstedt, Njemačka)
- Sterilne plastične epruvete za zamrzavanje stanične suspenzije od 1,5 mL (Nunc, Danska)
- Sterilne bočice za uzgoj adherentnih stanica s filterom, 75 cm² (Sarstedt, Njemačka)
- Filtri veličine pora 0,22 µm za vakuumfiltraciju s plastičnom bocom volumena 250 mL i 500 mL (TPP, Švicarska)

3.1.3. Oprema

- Mikrobiološki zaštitni kabinet klase II (Klimaoprema d.d., Hrvatska)
- CO₂ inkubator za stanične kulture Eppendorf 170L (Kendro Laboratory Product GmbH, Njemačka)
- Centrifuga s hlađenjem Hermle Z206A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- Spremnik za tekući dušik MVE XC 47/11-6SQ (Thermo Scientific, SAD)
- Hera freeze zamrzivač 400 L (Kendro Laboratory Product GmbH, Njemačka)
- Hladnjak i zamrzivač Dairei LFF 660 ST (GEMMA B&D d.o.o., Hrvatska)
- Invertni mikroskop MBL 3100 (Kruss Optronic, Njemačka)
- Fluorescentni mikroskop, TI-DH (Nikon Eclipse, Hrvatska)
- Vodena kupelj, VK1EN (Inkolab d.o.o., Hrvatska)
- Termostat, Heraeus B6 (Kendro Laboratory Product GmbH, Njemačka)
- PTS uređaj za mjerenje endotoksina Endosafe PTS (Charls River Laboratorie, SAD)
- Analitička vaga TE214S-0CE (Sartorius, Hrvatska)
- Automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Neubauerova komorica za brojanje stanica (Buffalo, SAD)
- Automatizirani uređaj za imunocitokemijsko bojanje Autostainer Link48 (Dako, Danska)

3.2. METODE

Prilikom provođenja eksperimenta koristila sam komercijalne 3T3 Swiss albino stanice (ATCC® CCL-92). Koristila sam zamrznute adherentne fibroblaste izolirane iz mišjih embrija čije je vrijeme udvostručenja (engl. *Population Doubling Time*) 18h. Stanice mišjih fibroblasta sam uzgajala u CO₂ inkubatoru te sam ih nakon rukovanja skladištila u tekućem dušiku. Ove stanice sam obrađivala u laboratoriju biosigurnosne razine skupine II.

3.2.1. Priprema hranjivih medija

3.2.1.1. Priprema medija za rast fibroblasta

Medij za rast fibroblasta (FM) koristila sam za uzgoj i rast 3T3 stanica koje su služile kao stanice hranilice za uspostavu kulture keratinocita. Prilikom izrade FM medija koristila sam sterilnu jednokratnu plastičnu bocu sa filterom od 500 mL i u nju ulila DMEM-a u koji sam postepeno dodavala komponente (Tablica 1). Dodala sam 50 mL FBS-a, 5mL L-glutamina i 5 mL antibiotika penicilina i streptomocina kako ne bi došlo do kontaminacije stanične kulture. Koristila sam 10%-tni FBS koji je izvor aminokiselina, peptida i proteina, faktora rasta, hormona, vitamina, minerala, lipida i drugih komponenti nužnih za proliferaciju i stimulaciju rasta stanica. Fetalni goveđi serum je također sadržavao inhibitore tripsina. Nakon FBS-a sam dodala L-glutamin koji je služio kao donor dušika u staničnom ciklusu prilikom biosinteze aminokiselina koje su građevni materijal proteina. Također je služio u *de novo* sintezi nukleotida prilikom nastanka genetičkog materijala. Nakon dodavanja svih komponenti medij sam profiltrirala pomoću filtra (veličine pora 0,2 μm), a zatim pravilno obilježila.

Tablice 1. Prikaz komponenti FM medija

Naziv	Tvrтка	Količina	Postotak %
DMEM	Sigma	250 mL	90%
FBS	Life Technologies	25 mL	10%
L-GLUTAMIN	Life Technologies	2,5 mL	1%
ABAM	Life Technologies	2,5 mL	1%

3.2.1.2. Priprema medija za rast keratinocita

Za uspostavljanje kulture keratinocita koristila sam GM medij (engl. *growth medium*) (Tablica 2). U DMEM hranjivu podlogu s visokom koncentracijom glukoze i kalcijevih iona dodala sam komercijalnu mješavinu nutrienata HAM's F12 (engl. *Nutrient mixture HAM's F-12*). Fetalni goveđi serum sam dodala u inaktivnom obliku. Poslije L-glutamina sam dodala mješavinu antibiotika penicilina, streptomocina i amfotericina koji su spriječili kontaminaciju stanične kulture. Nakon toga sam dodala sterilni adenin koji služi u izgradnji adenzotriposfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) koji gradi genetički materijal. Zatim sam dodala hormon trijodtrionin, inzulin i glukokortikoidni hormon hidrokortizon koji reguliraju metabolizam glukoze tako što povećavaju unutarstaničnu koncentraciju cikličkog adenzin monofosfata (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) te na taj način održavaju staničnu homeostazu. Dodala sam kolera toksina koji je faktor rasta te također utječe na povećanje unutarstaničnog cAMP-a i potiče proliferaciju keratinocita. Zatim sam dodala epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*, EGF) koji potiče diferencijaciju i proliferaciju stanica. Medij sam sterilizirala filterom pora veličina 0,22 μm i pravilno obilježila.

Tablica 2. Prikaz komponenti GM medija

Naziv	Tvrtka	Količina	Koncentracija	Postotak%
DMEM	Life Technologies	150 mL		60%
HAM's F12	Life Technologies	75 mL		30%
FBS	Life Technologies	25 mL		10%
L-glutamin	Life Technologies	5 mL	200 mM	2%
ABAM	Sigma	2,5 mL	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1%
ADENIN	Sigma	2,5 mL	2,43 mg/mL	1%
HIDROKORTIZON	Sigma	0,5 mL	0,2 mg/mL	0,2%
INZULIN	Sigma	0,250 mL	5 mg/mL	0,1%
KOLERA TOKSIN	Calbiochem	0,250 mL	0,1 μM	0,1%
TRIJODTIRONIN	Sigma	0,250 mL	1,36 ng/mL	0,1%
EGF	Life Technologies	0,250 mL	10,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,1%

3.2.1.3. Priprema medija za zamrzavanje fibroblasta i keratinocita

Stanične kulture je moguće zamrznuti zbog naknadnih analiza, eksperimenata ili ponovne primjene u terapiji. Medij za zamrzavanje je sadržavao 50% GM ili FM medija ovisno o tipu stanica koje sam trebala zamrznuti, 40% FBS-a i 10% DMSO-a (Tablica 3). Dimetilsulfoksid je služio kao krioprotektant te je sprječavao stvaranje kristala vode koji bi nastali prilikom snižavanjem temperature, kristali bi u protivnom oštetili membrane stanica.

Tablica 3. Komponente medija za zamrzavanje

Naziv	Tvrtka	Količina	Postotak %
GM	Sigma	5 mL	50 %
FBS	Life Technologies	4 mL	40 %
DMSO	Alchimia	1 mL	10%

3.2.2. Uzgoj stanica

3.2.2.1. Priprema hranjive podloge od 3T3 stanica

Za pripremu hranjive podloge sam koristila komercijalno dostupnu staničnu liniju 3T3 Swiss albino (ATCC® CCL-92™). Mišji fibroblasti ili 3T3 stanica su bili mezenhimskog porijekla, a služili su kao hranjiva podloga za uspostavu kulture keratinocita. One su bile tretirane sa mitomicinom C te su služile kao dodatni izvor hranjivih tvari. Prije uporabe stanice sam odledila u vodenoj kupelji na 37 °C. Zatim sam na stanice dodala 10 mL FM medija i centrifugirala četiri minute na 200 g te nakon toga pipetom odvojila supernatant od taloga u kojem su se nalazile 3T3 stanice. Na talog sam dodala 1 mL FM medij, resuspendirala pipetom, izbrojala stanice i zasijala u koncentraciji 2×10^6 u bočicu od 75 cm² u 15 mL GM medija. Stanice mišjih fibroblasta sam bila inkubirala dva sata na 37 °C s 5 µg/mL mitomicina C, tri puta isprala sa PBS i tripsinizirala. Dodatkom 15 mL GM medija neutralizirala sam tripsin. Pripremljenu hranjivu podlogu sam stavila u inkubator na 37 °C sa 5% CO₂ preko noći te na nju sutradan zasijala keratinocite u koncentraciji 2×10^6 stanica u dvije kultivacijske zdjelice za adherentne stanične kulture površine 75 cm². Po završetku sam napravila preparate od preostalih stanica i obojila bojom 0,05% kristal violet te slikala invertnim mikroskopom.

3.2.2.2. Uzgoj keratinocita

Za izradu eksperimenta sam koristila zaleđene stanice keratinocita. Prilikom odmrzavanja biološkog materijala bilo je potrebno nositi zaštitnu opremu te je bilo ključno u blizini imati pripremljenu posudu s ledom koja bi spriječila naglu promjenu tlaka i temperature koja bi u protivnom mogla dovesti do eksplozije epruvete. Odmrzavanje sam provela u plastičnoj stiropornoj posudi s poklopcem. Nakon odmrzavanja sadržaja epruvete na stanice sam dodala 2 mL GM medija i resuspendirala. Pomoću tripsanskog modrila koje sam pomiješala sa stanicama u omjeru 1:1 i Neubaerove komorice sam izbrojala stanice.

Suspenziju keratinocita sam zasijala u koncentraciji $1,5 \times 10^6$ u bočice veličine 75 cm^2 sa 15 mL GM medija na prethodno pripremljene i zasijane 2×10^6 3T3 stanice tretirane mitomicinom C. Svaka tri dana sam mijenjala hranjivi medij u staničnim kulturama uvijek dodajući GM medij s EGF-om.

Nakon deset dana prva pasaža je dosegla konfluentnost od oko 70% te sam stanice nakon provjere na invertnom mikroskopu tripsinizirala. Ukoliko je konfluentnost stanica prilikom uzgoja bila veća od 90%, došlo bi do prestanka dioba stanica zbog kontaktne inhibicije. Sterilnom pipetom sam uklonila GM medij iz kultivacijske posude koji bi inaktivirao tripsin da je ostao u posudi. Na stanice sam dodala 8 mL DPBS-CMF na 1 - 2 minute kako bih isprala zaostali GM medij. Pipetom sam uklonila preostali DPBS-CMF medij te sam na stanice dodala 2 mL 0,02% EDTA otopine i inkubirala 1 - 2 minute te dodatno isprala stanice i uklonila mrtve mišje fibroblaste. Pipetom sam pažljivo uklonila 0,02% EDTA, a zatim dodala 5 mL 0,25% tripsina / 1 mM EDTA. Sadržaj sam inkubirala na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 4 - 5 minuta. Nakon odvajanja stanica od podloge dodala sam 10 mL GM medija kako bi inaktivirala tripsin. Suspenziju sam resuspendirala, a zatim centrifugirala četiri minute na 200 g na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Pažljivo sam odvojila supernatant, a na talog sam dodala 2 mL GM medija. Nakon brojenja stanica zasijala sam sekundarne kulture keratinocita na 3T3 stanice.

Nakon tripsinizacije i centrifugiranja sam uklonila supernatant, a na talog sam dodala 1,7 mL medija za zaleđivanje keratinocita. Sadržaj epruvete sam pažljivo resuspendirala kako bi se stvorile pojedinačne stanice. U epruvetu od 2 mL sam stavila 2×10^6 stanica i pohranila na -80°C u zamrzivaču. Nakon što su stanice bile u zamrzivaču 24 h, promatrala sam premještanje u spremnik kriogene tekućine na $-186 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3. Određivanje ukupnog broja i vijabilnosti stanica

Paralelno s određivanjem ukupnog broja stanica odredila sam vijabilnost stanica testom s tripanskim modrilom. Otpipetirala sam 50 μL originalne stanične suspenzije sa keratinocitnim stanicama i dodala 50 μL 0.4% tripansko modrila. Zbog miješanja u omjeru 1:1 faktor razrjeđenja je 2, a ukupni volumen je 100 μL . Suspenziju u epruveti sam inkubirala 2 – 3 min te je boja tripansko modrilo ušla u mrtve stanice sa oštećenom membranom. Na Neuberovu komoricu sam stavila pokrovno stakalce i dodala 10 μL otopine sa resuspendiranim keratinocitima na gornju i donju polovicu. Neubauerova komorica ima na svakoj polovici mrežu za brojanje (veličine polja od $3 \times 3 \text{ mm}^2$). Prebrojala sam stanice u četiri kutna kvadrata koji imaju po 16 kvadratića. Tripansko modrilo selektivno boji mrtve stanice. Nakon brojanja mrtvih stanica sam prebrojala ukupan broj stanica. Žive stanice su bile one s neoštećenom staničnom membranom i one nisu propuštale boju tripanskog modrila te su ostale nebojene. Broj stanica po mL sam izračnala tako da sam prosjek broja stanica iz 4 kvadrata pomnožila s faktorom razrjeđenja i s korekcijskim faktorom koji je iznosio 10^4 . Za ukupan broj stanica sam pomnožila broj stanica po mL s volumenom u mL originalne stanične suspenzije. Staničnu vijabilnost sam računala tako da sam ukupan broj vijabilnih stanica (nebojenih) podijelila s ukupnim brojem stanica (obojene + nebojene).

3.2.4. Djelotvornost stvaranja kolonija

Prilikom uzimanja biopsije pratila sam djelotvornost stvaranja kolonija tj. CFE (engl. *colony forming efficiency*). Zasijala sam 1500 stanica u Petrijevu zdjelicu promjera 100 mm. Površina Petrijeve zdjelice od 100 mm iznosi 60,1 cm^2 . Test učinkovitosti stvaranja kolonija sam napravila u duplikatima za prvu i drugu pasažu. Djelotvornost stvaranja kolonija računa se na način da se broj naraslih kolonija podijeli s brojem zasijanih stanica i pomnoži sa 100 kako bismo rezultat izrazili u obliku postotka ($\text{CFE} (\%) = (\text{broj naraslih kolonija} / \text{broj zasijanih stanica}) \times 100$).

3.2.5. Imunofenotipizacija protočnim citometrom

Članovi Laboratorija za imunologiju, Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu su proveli analizu protočnim citometrom. Protočnom citometrijom (engl. *Flow cytometry*, FC) su bile analizirane pojedinačne stanice (engl. *single cell analysis*) u suspenziji sekundarne kulture keratinocita s ciljem utvrđivanja udjela ostatnih 3T3 stanica koje služe kao stanice hranilice pri uzgoju keratinocita. Suspenziju stanica je bila raspodijeljena u tri epruvete. U prvu epruvetu nisu dodana protutijela, u drugu epruvetu je dodano rat IgG1 PE protutijelo (izotipska kontrola), a u treću epruvetu je dodano *rat IgG1 anti-mouse Feeder Cells Antibody (Clone mEF-SK4, Miltenyi Biotech, Germany)* protutijelo koje je bilo označeno fluorokromom peridininil-klorofilinom (PE). Za izotipsku kontrolu je korišteno nespecifično rat IgG1 protutijelo obilježeno fluorokromom PE. Naime, stanice na sebe mogu nespecifično vezati protutijelo (npr. Fc-ovisno vezanje) te je korištena izotipska kontrola za postavljanje granice između pozitivnog odnosno negativnog fluorescencijskog signala.

Prilikom analize stanica je korištena plava laserska zraka (blue488). Laser je propuštao pojedinačne stanice na koje je okomito padala laserska zraka te se mjerio optički otklon odbijenih laserskih zraka. Vrijednost FSC (engl. *Forward-scattered light*) je mjera koja je opisala veličinu stanice (zrake lasera koje prođu oko stanice). Granulacija i unutarnja kompleksnost stanica su opisane pomoću SSC (engl. *Side-scattered light*) vrijednosti (otklonjene zrake lasera pod kutem većim od 30°, najčešće 90°). Također je izmjeren intenzitet fluorescencije signala fluorokroma koji je bio vezan na specifično protutijelo. Uzorci su bili analizirani BD LRS II protočnim citometrom (Slika 4).



Slika 4. Protočni citrometar BD LRS II korišten za provjeru postotka ostatnih 3T3 stanica.

3.2.6. Imunocitokemija

Imunocitokemija je jedna od metoda kojom se mogu detektirati proteini. Temelji se na specifičnom vezanju antitijela i antigena u identifikaciji specifičnih tkivnih sastavnica, a pri tome kombinira biokemijske, histološke i imunološke metode. Prilikom izvedbe ove metode struktura proteina ostaje očuvana i stanice se mogu i naknadno proučavati omogućavajući vizualizaciju raspodjele i lokalizaciju specifičnih staničnih komponenti. Nakon fiksacije, primarna protutijela (Tablica 4) se vežu na točno određeni protein (antigen specifično mjesto) te omogućuju vizualizaciju njegove prostorne lokacije. Sekundarno protutijelo, koje se veže na mišje i zečje primarno protutijelo, je povezano s enzimom peroksidazom iz hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) koji pretvara kromogen supstrat 3,3'-diaminobenzidine (DAB) u smeđi precipitat u tkivu te tako vizualizira mjesto vezanja primarnoga specifičnog antitijela i ciljanog antigena.

Za metodu imunocitokemije sam koristila 1mL primarne kulture keratinocita u kojoj je bilo 10^5 stanica i 1mL sekundarne kulture keratinocita u kojoj je bilo $0,5 \times 10^6$ keratinocita koje sam uzela nakon tripsinizacije. Nakon blagog resuspendiranja pipetom sam nanijela po 50 μ L suspenzije stanica koje prethodno nisu bile tretirane na 14 stakalaca. Komercijalna stakla za imunocitokemijska i imunohistokemijska bojenja su pozitivno nabijena kako bi se stanice bolje prihvatile na njih, a u tu svrhu sam ostavila stakalca s razmazima stanica na zraku kako bi se stanice što bolje zalijepile i ispario pufer. Nakon sušenja, stakalca s razmazom stanica sam fiksirala u 4 min ledenom acetonu, koji je prethodno bio 30 minuta na -20°C , te sam ih nakon toga blago isprala u PBS-u. Zatim sam stakalca kuhala u citratnom puferu (pH 7,2) sadržan u komercijalnom kitu HercepTest[®] Dako 20 minuta na 96°C , koji je dodatno permeabilizirao staničnu i jezgrinu membranu kako bi primarno protutijelo moglo ući u stanicu. Nakon kuhanja stakla sam ohladila 15 min u istom puferu.

Tablica 4. Prikaz primarnih protutijela proizvođača Agilent Dako korištenih u istraživanju

Primarno protutijelo	Klon	Razrjeđenje	Biljeg specifičnosti
Citokeratin 14	34 β E12	1:100	epitelne stanice bazalnog porijekla
Citokeratin 19	RCK108	1:50	diferencirane stanice
Ki-67	MIB-1	1:100	stanice u proliferaciji
p63	DAK-p63	1:100	matične stanice
Vimentin	V9	1:500	mezenhimske stanice

Imunocitokemijsko bojanje sam provela u automatiziranom uređaju Autostainer Link48 (Slika 5). Prije primjene primarnog protutijela na razmaze stanica se nanosi 200 μ L 3% vodikovog peroksida radi blokade endogenih peroksidaza i smanjenja nespecifičnosti bojanja 5 min na sobnoj temperaturi te se zatim ispire PBS-om. Potom se na stanice apliciralo po 200 μ L primarnih protutijela navedenih u Tablici 4 te ostavi 30 min na sobnoj temperaturi, ispire PBS-om, a potom se aplicira sekundarno protutijelo Dako EnVision FLEX/HRP K800 također 30 min na sobnoj temperaturi.

Nakon drugog ispiranja uređaj je nanosio po 200 μ L DAB kromogena 10 min na sobnoj temperaturi, isprao destiliranom vodom i dodao hematoksilin za kontrastno obojenje, 2 min na sobnoj temperaturi. Stakalca sam zatim dehidrirala u alkoholu, kratko stavila u ksilen kako bi se razbistrila i pokrila pokrovnicom i zatim promatrala obojenje pod svjetlosnim mikroskopom. Koristila sam sekundarno protutijelo iz komercijalnog kita Dako EnVision FLEX/HRP K800 koje je povezano s HRP te detektira primarna antitijela iz kunića i miša. Sva primarna protutijela su nastala imunizacijom u mišu (engl. *Mouse Anti-Human Antibody*). Analiza je napravljena u Klinici za tumore, KBC Sestre milosrdnice.



Slika 5. Prikaz automatiziranog uređaja Autosainer Link48.

3.2.7. Metoda određivanja endotoksina

Bakterijski endotoksini su male hidrofobne molekule, po kemijskom sastavu su složeni lipopolisaharidi koji se nalaze u vanjskoj staničnoj membrani gram-negativnih bakterija. Zbog opasnosti koju mogu imati visoke koncentracije endotoksina na zdravlje čovjeka mjerila sam njihovu koncentraciju. Uređaj za mjerenje endotoksina se temelji na kinetičko kromogenom testu LAL tijekom kojeg se koncentracija endotoksina određuje prema količini otpuštenog kromogenog peptida djelovanjem enzima lizata koji se aktivira u prisutnosti endotoksina. Intenzitet razvijene boje proporcionalan je koncentraciji endotoksina. Zbog osjetljivih tehničkih varijabli, test LAL je vrlo zahtjevan, te zahtjeva materijal bez prisutnih pirogena, uključujući pribor i vodu. Napravila sam dva razrjeđenja. Za razrjeđenje 10x dodala sam 900 μL vode LAL (engl. *Limulus Amebocyte Lysate*) i 100 μL biološkog uzorka, a za razrjeđenje 50x sam dodala 100 μL uzorka razrjeđenja 10x i 400 μL vode LAL. Nakon pokretanja PTS uređaja (engl. *portable test system*) pričekala sam nekoliko minuta dok uređaj nije postigao temperaturu od 37 °C te se pojavila obavijest na ekranu za umetanje uloška. Odstranila sam zaštitnu vrećicu sa uloška i uložak sam lagano pogurala do kraja uređaja PTS, a jažice sam ostavile okrenute prema gore. Nakon što sam unijela sve potrebne informacije u PTS uređaj, pojavio se natpis dodaj uzorak. Otpipetirala sam po 25 μL u svaku od četiri jažice uloška i pritom sam pazila da vrh pipete ne spustim na dno rupice. Nakon pripreme pumpa je povukla uzorke u testne kanale i započela test. Endotoksin test sam provela pomoću uređaja PTS u Laboratoriju za kontrolu kvalitete, istraživanje i razvoj, Odjela za kontrole kvalitete u transfuziji, staničnoj i tkivnoj terapiji (Slika 6).



Slika 6. Prikaz određivanja endotoksina pomoću uređaja PTS.

3.2.8. Detekcija prisutnosti *Mycoplasma* spp.

Uzorkovala sam 2 mL hranjivog medija iz stanične kulture koji su analizirani u Bolnici za zarazne bolesti „dr. Fran Mihavljević“ u Zagrebu. Kontaminacija kulture bakterijom *Mycoplasma* spp. mogla bi proći nezapaženo jer je infekcija asimptomatske prirode. Bakterija *Mycoplasma* spp. nema staničnu stjenku i prolazi kroz filtere pore 0,2 μm te uvijek postoji opasnost od kontaminacije cijele čiste sobe stoga ju je iznimno važno na vrijeme detektirati u uzorku stanične kulture. Stanične kulture sam analizirala na prisutnost *Mycoplasma* spp. na kraju primarne pasaže. Mikoplazme je moguće detektirati RT PCR metodom u stvarnom vremenu. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*, PCR) je metoda sa najvećom osjetljivošću za detekciju kontaminacije mikoplazmama u uzorcima stanične kulture. Kod RT PCR metode se mjeri količina umnožene DNA tijekom nastajanja jer se prilikom umnažanja koriste fluorescentno obilježene sonde koje se vežu na DNA početnice. Analiza je provedena na 10 μL izolirane DNA iz uzorka. Za detekcijski limit je korišten prihvaćeni kriterij od 10 CFU/mL. Ovisno o vrsti detektirane *Mycoplasma* spp. prihvatljiv je detekcijski limit u intervalu od $\leq 2,5$ do ≤ 10 CFU/mL.

3.2.9. Mikrobiološko uzorkovanje okoliša i hranjivog medija

Uzorkovala sam 13 - 15 mL hranjivog medija iz jedne pasaže te uz ostale uzorke kontaktnih površina poslala na mikrobiološku kontrolu koja je obavljena u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 3 u Zagrebu.

Cjelokupna izrada ATMP bila je praćena provjerom sterilnosti svih parametara okoliša kao što su; zrak, kontaktne površine, prsti i zaštitno odijelo, voda iz vodene kupelji i CO₂ inkubatora. Cijeli postupak se provodio u aseptičnim uvjetima GMP i GLP u mikrobiološkom kabinetu za sterilna rad. Čisti prostor i sterilni materijal su bili preduvjet sigurne izrade.

Tijekom detekcije bakterija, gljiva i plijesni u zraku bila sam koristila Petrijeve zdjelice s agarom veličine 90 mm (Slika 7). Zrak sam testirala njegovim taloženjem na TSA3 (engl. *Trypcase Soy 3P agar*) mikrobiološke ploče. Nakon uzimanja uzoraka zraka Petrijeve zdjelice sam zatvorila, obilježila kodom, zabilježila vrijeme uzorkovanja, zaštitila parafilmom i poslala na analizu.



Slika 7. Prikaz TSA3 (engl. *TrypCase Soy 3P agar*) mikrobiološke ploče (90 mm) za provjeru sterilnosti čistih prostora

Za detekciju bakterija, gljiva i plijesni na ravnim površinama kao što su radni stolovi, ormarići, laboratorijska oprema, podovi i paneli koristila sam kontaktne ploče CT3P (engl. *Count-Tact 3P agar*) veličine 55 mm (Slika 8). Mikrobiološke ploče sam pritisnula na površinu 10 sekundi, zatvorila poklopac, obilježila, zaštitila parafilmom kako ne bi došlo do dodatnih kontaminacija i poslala na analizu.



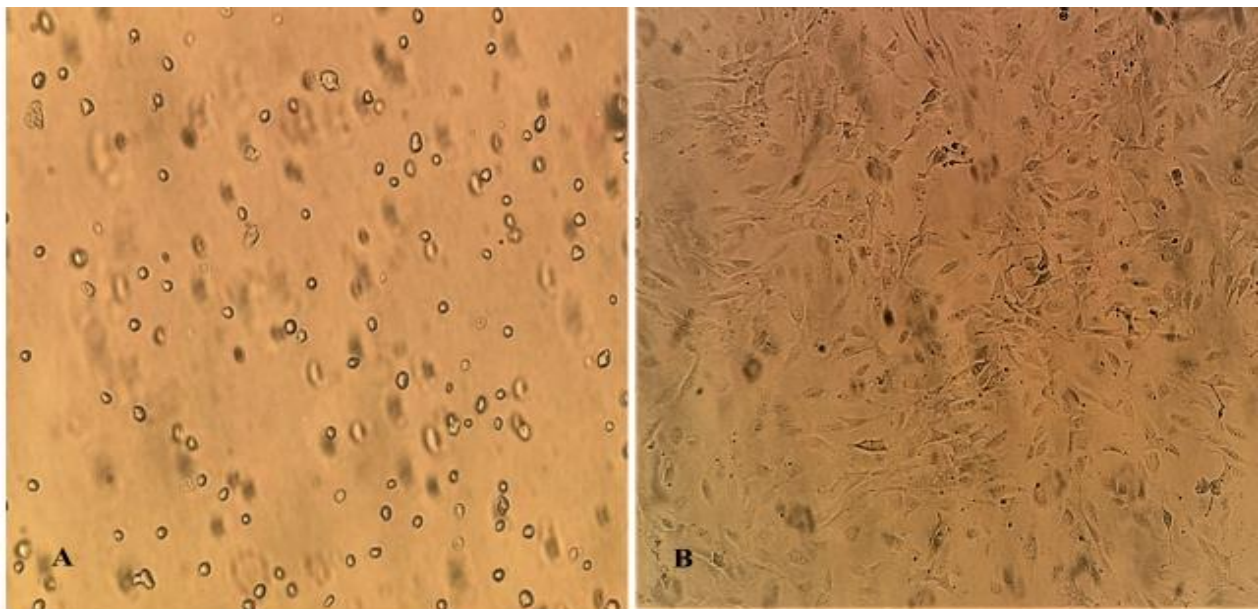
Slika 8. Prikaz CT3P (engl. *Count-Tact 3P agar*) mikrobiološke ploče (55 mm) za provjeru sterilnosti kontaktnih površina

Otiske rukavica sam uzimala nakon rada sa stanicama ili tkivima i prije promjene rukavica. Nakon uzimanja uzoraka otisaka ruku TSA3 Petrijeve zdjelice (Slika 7) sam zatvorila, obilježila kodom, zabilježila vrijeme uzorkovanja, zaštitila parafilmom i poslala na analizu. Provela sam mikrobiološku kontrolu odjeće na tri mjesta (vrat, rukav i koljeno) pomoću kontaktnih ploča CT3P (Slika 8). Zbog sigurnosti sam nosila sterilnu obuću, sterilno jednokratno odijelo i dvostruke sterilne rukavice u klasi 1B. Mikrobiološku kontrolu vode iz vodene kupelji i CO₂ inkubatora analizirala sam sterilnom pipetom. Uzorkovala sam 35 mL vode i u sterilnim epruvetama poslala na analizu.

4. REZULTATI

4.1. Rast 3T3 stanica u FM mediju

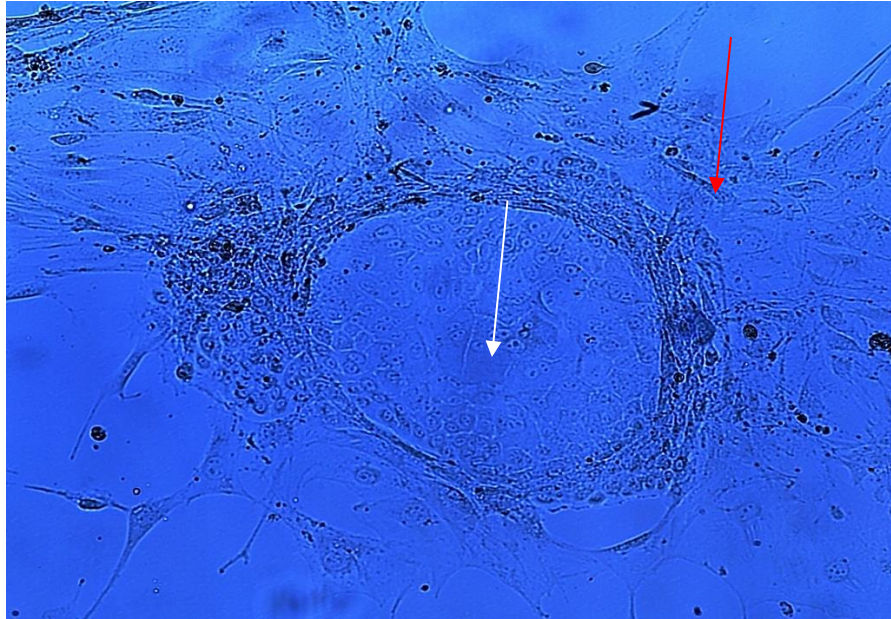
Izradi ATMP-a prethodila je priprema stanica hranilica koje sam odledila i zasijala u FM medij. Tek zasijane 3T3 stanice sam promotrila pod invertnim mikroskopom (Nikon, Eclipse) te uočila okrugle stanice koje se nisu odmah uhvatile za dno posude (Slika 9A). Nakon 24h u CO₂ inkubatoru fibroblasti su poprimili vretenasti oblik i adherirali na dno kultivacijske posude (Slika 9B). Fibroblaste sam tretirala mitomicinom C i na njih zasijala keratinocite. Glavna uloga stanica hranjive podloge je izvor hranjivih tvari potrebnih za rast keratinocita.



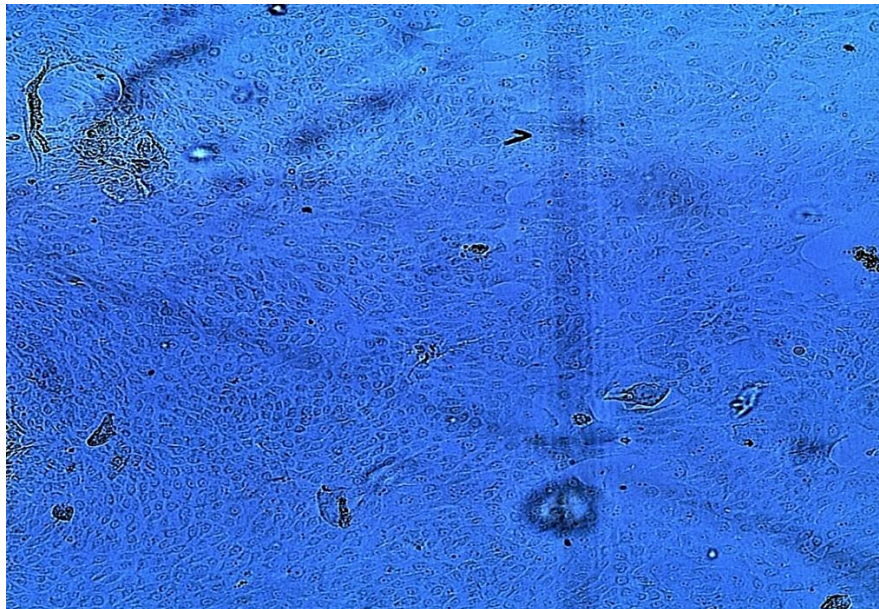
Slika 9. Prikaz 3T3 fibroblasta tek zasijanih (A) i nakon 24 h (B) (Nikon, Eclipse, 100x)

4.2. Rast keratinocita na hranidbenoj podlozi od 3T3 stanica

Kolonije od oko 10-ak stanica bile su vidljive nakon prva tri dana. Keratinociti su bili heksagonalnog oblika, dok su mišji fibroblasti bili vretenasti i razgranati (Slika 10). Nakon četiri do pet dana kružne kolonije keratinocita su se spojile jedna s drugom te potisnule mišje fibroblaste. Nakon dvanaest dana nastale su oko 85% konfluentne kulture keratinocita koje su sadržavale $10 - 12 \times 10^6$ keratinocita (Slika 11).



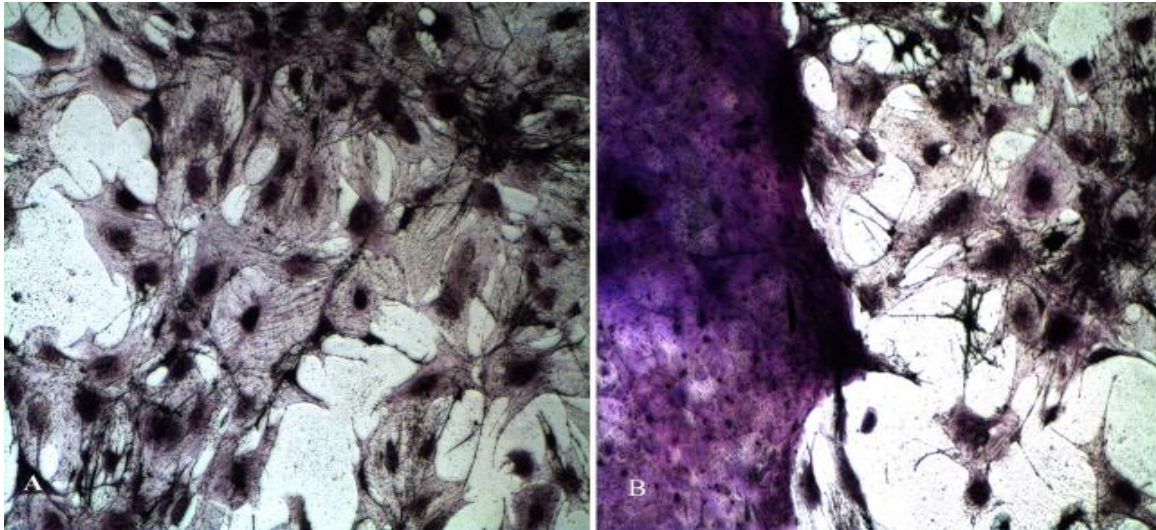
Slika 10. Prikaz kolonije keratinocita nakon pet dana uzgoja. Keratinociti su heksagonalnog oblika označeni bijelom strelicom, dok su mišji fibroblasti vretenasti i razgranati označeni crvenom strelicom (Nikon, Eclipse, 100x).



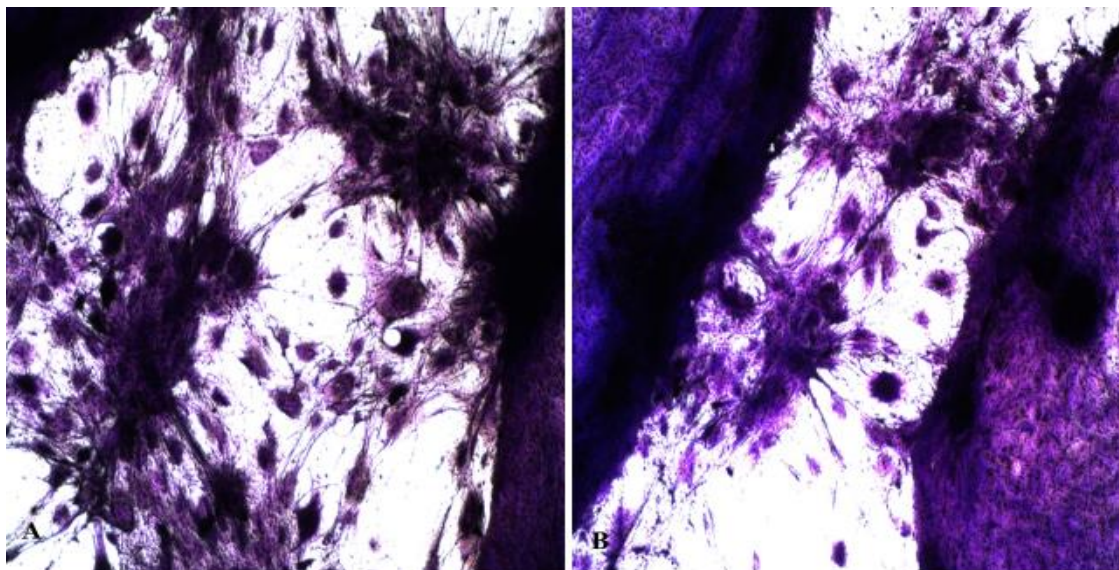
Slika 11. Konfluentna kultura keratinocita na hranjivoj podlozi uslikana dvanaesti dan uzgoja. Keratinociti su potpuno prerasli 3T3 stanice (Nikon, Eclipse, 100x)

Nakon završetka eksperimenta napravila sam preparate od preostalih stanica i obojila bojom 0,05% kristal violet te slikala pod invertnim mikroskopom pri povećanju od 400 puta

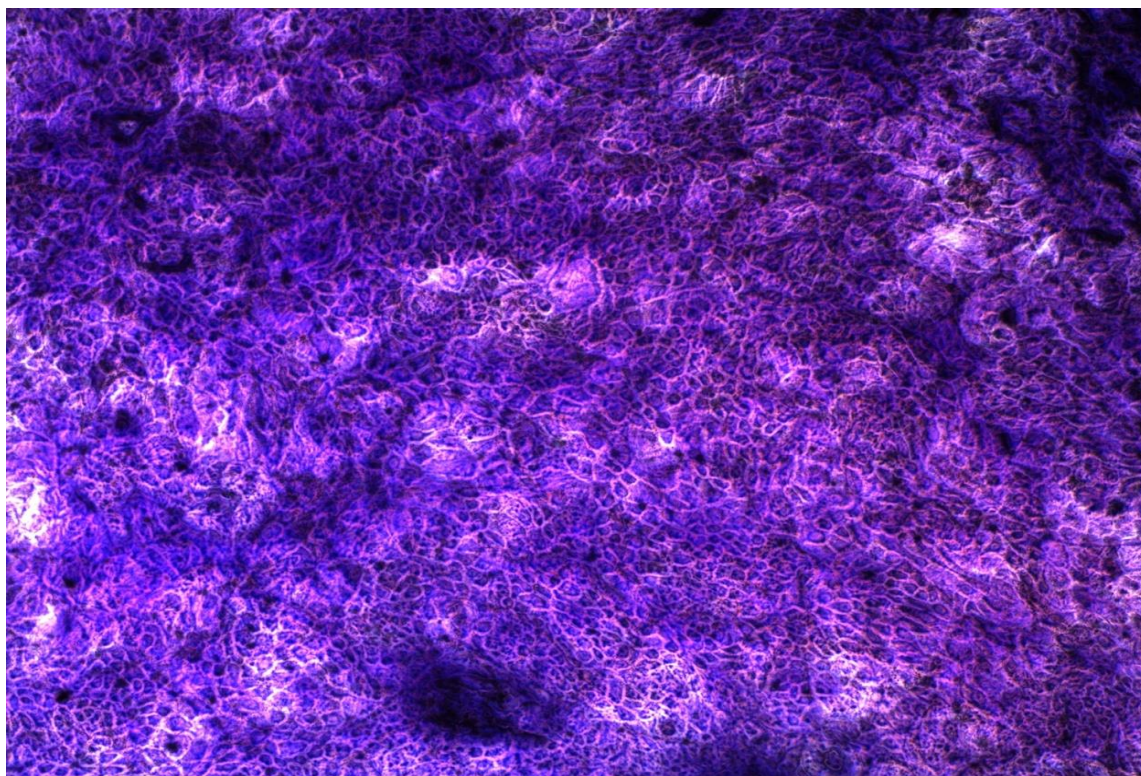
(Slika 12). Na kraju sam preparat slikala na nekoliko različitih dijelova te promotrila kolonije keratinocita između kojih se nalazila hranjiva podloga. Kolonije keratinocita su se postepeno približavale i naposljetku spojile te tako potisnule 3T3 stanice (Slika 13, 14).



Slika 12. Prikaz mreže fibroblasta čije su jezgre i citoplazme puno veće od stanica keratinocita. Na slici B su uz fibroblaste vidljivi ljubičasto obojeni keratinociti (Nikon, Eclipse, 400x).



Slika 13. Prikaz mreže fibroblasta čije su jezgre i citoplazme puno veće od ljubičasto obojene kolonije keratinocita (Nikon, Eclipse , 400x)



Slika 14. Prikaz kulture keratinocita koja je potpuno konfluentna (Nikon, Eclipse, 100x).

4.3. Test vijabilnosti stanica

Tripansko modriilo selektivno je obojalo nevijabilne stanice, a žive stanice su ostale neobojane jer nisu imale oštećenu staničnu membranu te nisu propuštale boju. Zbog pogodnih i strogo kontroliranih uvjeta te redovite promjene medija, vijabilnost testiranih stanica je bila > 95%, što je pogodno za kliničku primjenu. Mrtve stanice povećavaju mogućnost upale stoga nisu poželjne prilikom kliničke primjene (Tablica 5).

Tablica 5. Rezultati testa vijabilnosti stanica sekundarne pasaže.

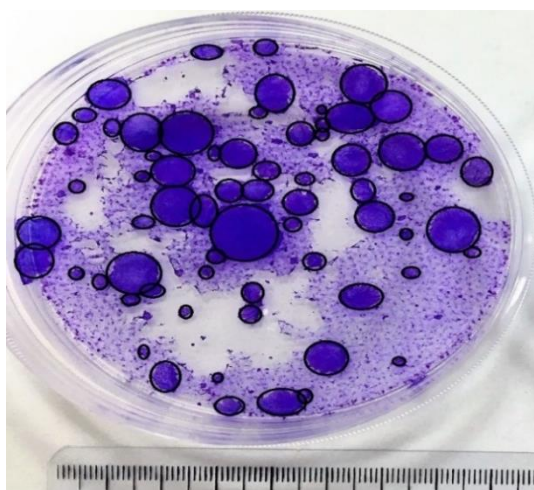
Datum testiranja	Ukupan broj stanica	Broj živih stanica	Postotak vijabilnosti
09.03.2020.	$15,5 \times 10^6$ st/10mL	$14,75 \times 10^6$ st/10mL	95,2%
09.03.2020.	$14,75 \times 10^6$ st/10mL	$14,2 \times 10^6$ st/10mL	96,3%

4.4. Djelotvornost stvaranja kolonija

Djelotvornost stvaranja kolonija (engl. *Colony Forming Efficiency*, CFE) tj. klonogeničnost sam provjerila u duplikatima za prvu i drugu pasažu. Zasijala sam 1500 stanica po Petrijevoj zdjelici (Ø 100 mm) te sam ih obojila bojom 0,05% kristal violet 14. dan uzgoja. Na slici 17 i 18 se vide ravnomjerno zasijani keratinociti u obje Petrijeve zdjelice, a kolonije su u prosjeku bile veličine od 5 - 8 mm uglavnom pravilnog, kružnog oblika. CFE sam računala u duplikatima za prvu i drugu pasažu (Slika 15, 16).



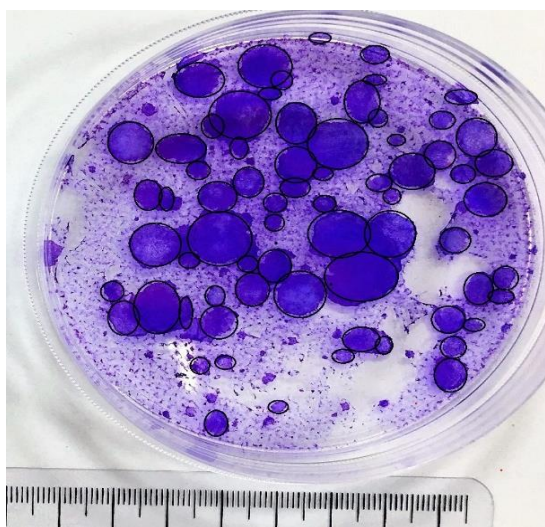
A) p = 1



B) CFE = 4,40% (obilježene kolonije)

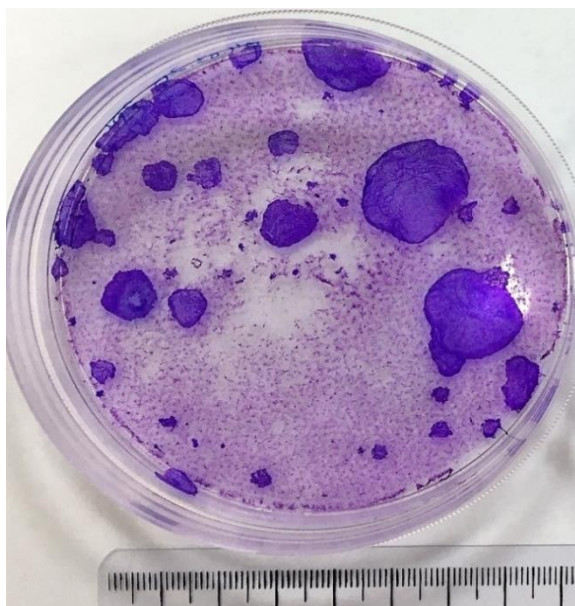


C) p = 1

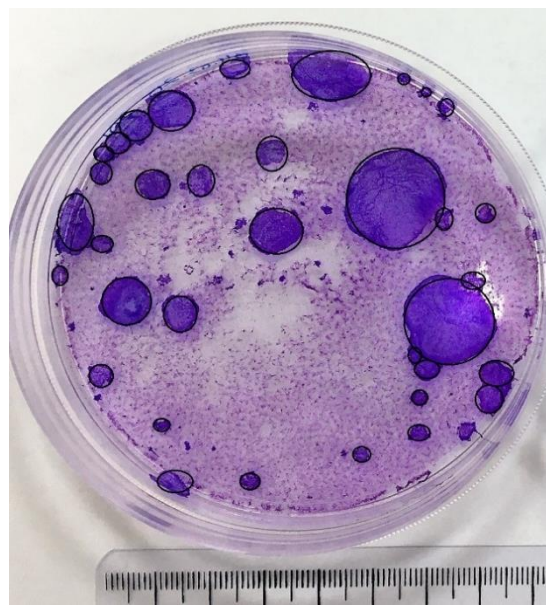


D) CFE = 4,60 % (obilježene kolonije)

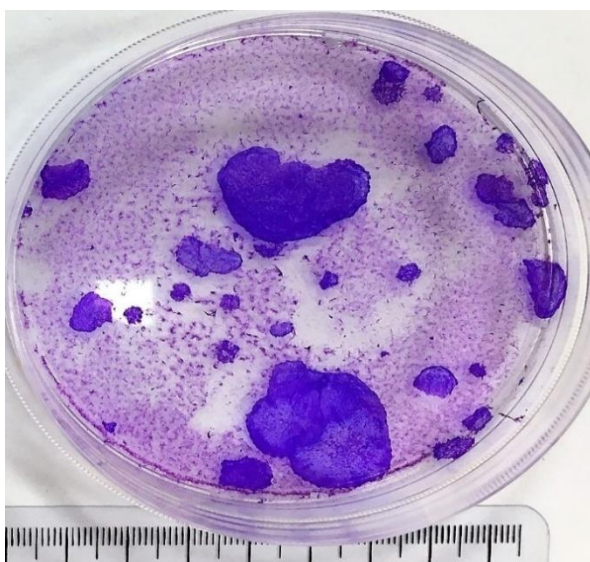
Slika 15. Prikaz neobilježenih Petrijevih zdjelica (A,C). Prikaz obilježenih kolonija u Petrijevoj zdjelici (B,D). U prvoj Petrijevcu prve pasaže (p = 1) učinkovitosti stvaranja kolonija iznosi 4,40% (66 kolonija), a u drugoj Petrijevcu učinkovitosti stvaranja kolonija iznosi 4,60% (69 kolonija).



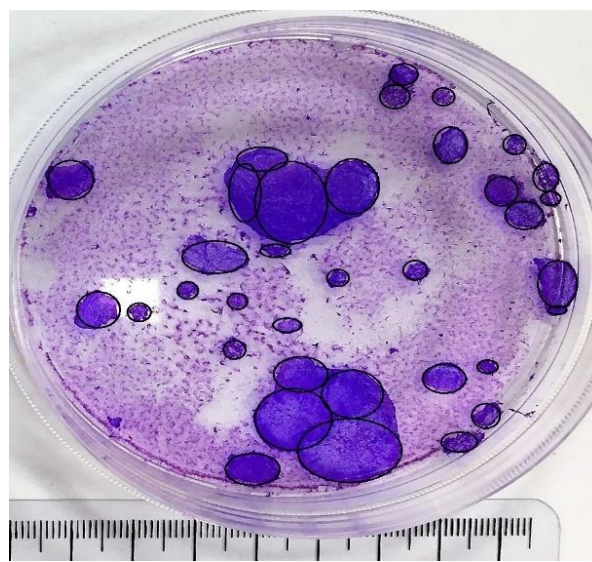
A) p = 2



B) CFE = 2,13% (obilježene kolonije)



C) p = 2

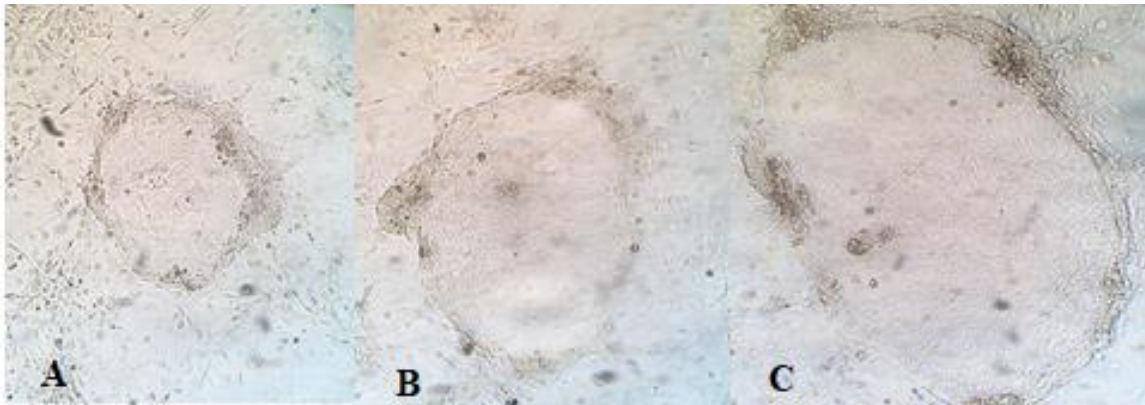


D) CFE = 2,26% (obilježene kolonije)

Slika 16. Prikaz neobilježenih Petrijevih zdjelica (A,C). Prikaz obilježenih kolonija u Petrijevoj zdjelici (B,D). U prvoj Petrijevcu druge pasaže (p = 2) učinkovitosti stvaranja kolonija iznosi 2,13% (32 kolonije), a u drugoj Petrijevcu učinkovitosti stvaranja kolonija iznosi 2,26% (34 kolonije).

Kod stanične kulture keratinocita p = 2 uočila sam pad učinkovitosti stvaranja kolonija (Slika 16). Primijetila sam veću klonogeničnost (kružne kolonije pravilnog oblika, veličine \geq 10 mm tzv. holoklonove) kod pasaže p = 1 (Slika 15).

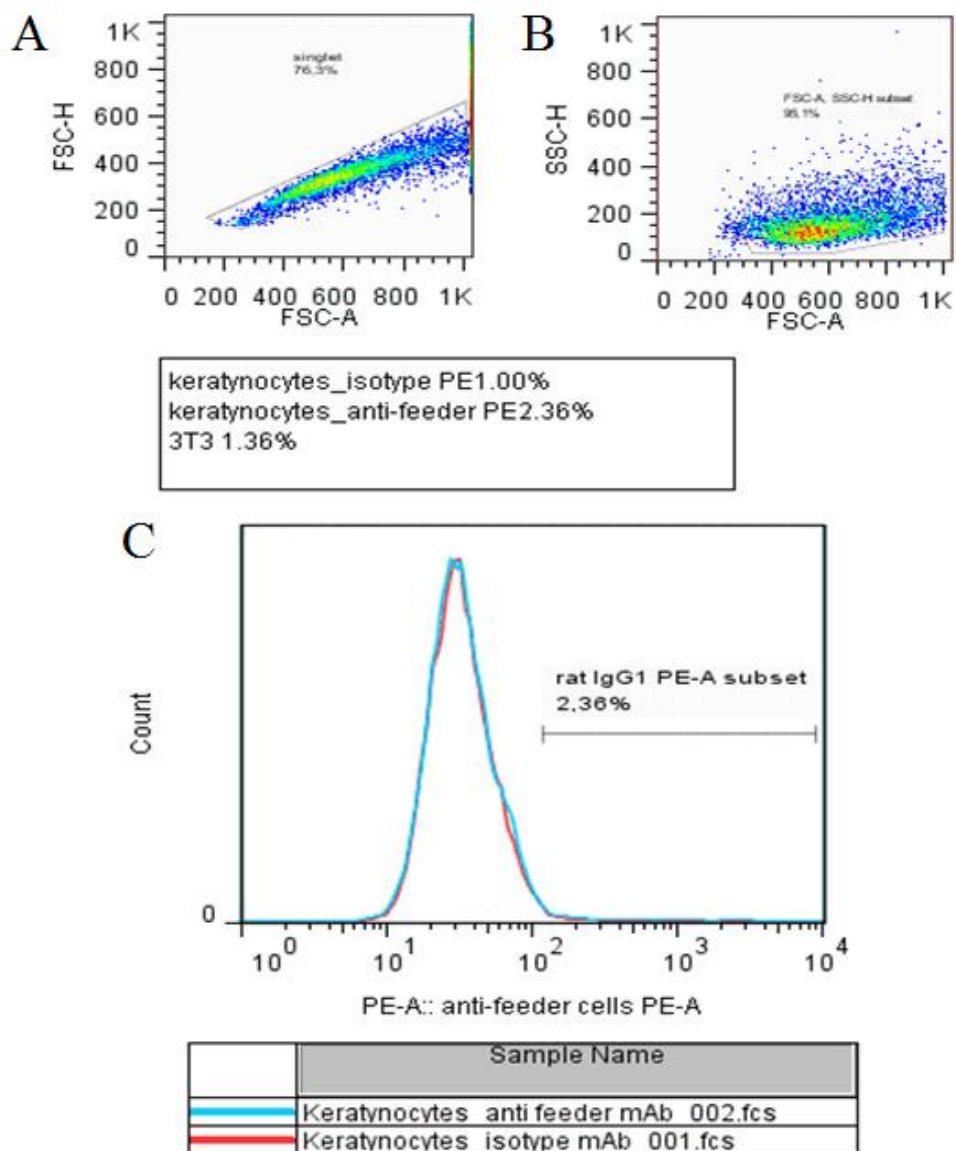
Makroskopske kolonije keratinocita su nastale već šest dana od nasađivanja. Nakon 14 dana uočila sam tri tipa kolonija unutar Petrijeve zdjelice. Neke od kolonija su bile $< 5 \text{ mm}^2$ i nisu narasle do makroskopskih veličina te sam ih klasificirala kao paraklonove (Slika 17A). Kolonije srednje veličine sam klasificirala kao meroklonove (Slika 17B), oni su rasli progresivno do makroskopskih veličina ($< 10 \text{ mm}^2$), ali nisu dosegli istu veličinu kao holokloni. Uočila sam velike kolonije čije je površina bila $> 10 \text{ mm}^2$. Takve stanice su bili holokloni tj. matične stanice i imale su najveći potencijal rasta (Slika 17C).



Slika 17. Prikaz kolonije paraklona koji nema sposobnost prolifracije (A), meroklona (B) i holoklona koji imali veliku sposobnost prolifracije, holoklonovi su matične stanice (C) (Nikon, Eclipse, 400x).

4.5. Rezultati imunofenotipizacije protočnim citometrom

Prilikom analize stanica korištena je plava laserska zraka (blue488). Uzorci su bili analizirani BD LRS II protočnim citometrom, pomoću softvera BD FACS Diva, te su potom obrađeni programom FlowJo. Na prvom grafu (FSC-H/FSC-A) svaka pojedinačna točka je prikazivala pojedinačne stanice jer je za interpretaciju rezultata bilo potrebno promatranje samo pojedinačnih stanica bez većih nakupina stanica i staničnog smeća. Varijabla FCS-A je obrađivala prikupljene signale laserskih zraka unutar cijele Gaussove krivulje i mjerila veličinu stanica, a SSC-H je bilježila podatke o visini energije te opisivala zrnatost stanica. Na histogramu sam bila promatrala fluorescencijsku skalu za PE detektor koja je pokazivala intenzitet fluorescencije. Pomoću izotipske kontrole je bila postavljena granica za negativno i pozitivno na 1% ukupnih stanica. Broj stanica pozitivnih na anti-feeder protutijela iznosio je 2,36% no nakon oduzimanja vrijednosti za izotipsku kontrolu je dobiveno 1,36% 3T3 mišjih stanica od ukupnog broja analiziranih stanica, dok je prihvatljiv rezultat bio $< 5\%$ (Slika 18).



Slika 18. Grafički prikaz postotka pojedinačnih stanica (A), razdiobe stanica prema veličini i granuliranosti (B) te udjela mišjih 3T3 stanica u sekundarnoj kulturi keratinocita (C). Graf (FSC-H/FSC-A) prikazuje 76,3% pojedinačnih stanica (A). Prikaz varijable FCS-A koja mjeri veličinu stanica, a SSC-H opisuje zrnatost stanica, uzorak sadrži 95,1% populacije pojedinačnih stanica slične veličine i zrnatosti (B). Broj pozitivnih stanica na anti-feeder protutijelo iznosi 2,36%, oduzimanjem vrijednosti izotipske kontrole je ukupno 1,36% 3T3 mišjih stanica od ukupnog broja analiziranih stanica. Plavom linijom je označen uzorak stanica obilježenih izotipskim protutijelom kako bi se utvrdilo nespecifično vezanje i omogućilo postavljanje granice pozitivnog signala. Crvena linija pokazuje stanični uzorak obilježen specifičnim protutijelom za 3T3 stanice *Feeder Cells Antibody, anti-mouse, Clone mEF-SK4* (C).

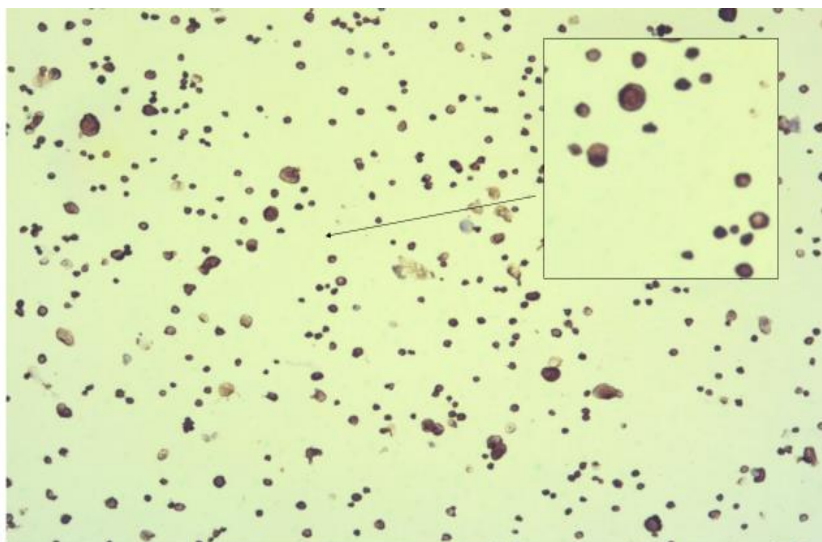
4.6. Rezultati imunocitokemijske analize

U istraživanju sam koristila nekoliko primarnih protutijela za detekciju više tipova stanica. Citokeratini su epitelni biljezi koji su svojstveni svim epitelnim tkivima, a nalaze se u citoplazmi stanica dok je vimentin biljeg mezenhimalnih stanica također izražen u citoplazmi. Biljeg proliferacije Ki-67 i protein p63 su izraženi u jezgri. Specifični citokeratin 14 (CK14) izražen je u mitotski aktivnim stanica bazalnog sloja (matične stanice). Citokeratin 19 (CK19) se javlja u stanicama tijekom diferencijacije, ali se gubi u potpuno diferenciranim, zrelim keratinocitima. Biljezi Ki-67 i p63 se nalaze u jezgri. Biljeg Ki-67 pokazuju samo stanice u diobi dok biljeg p63 pokazuje postotak matičnih stanica koji ulaze u diferencijaciju. Vimentin je biljeg mezenhimalnih stanica, a u ovom istraživanju bio je potpuno negativan jer su se matične stanice keratinocita diferencirale samo u epidermalne stanice (Tablica 6).

Tablica 6. Prikaz zastupljenosti stanica pozitivnih na testirane biljege u primarnoj i sekundarnoj pasaži keratinocita.

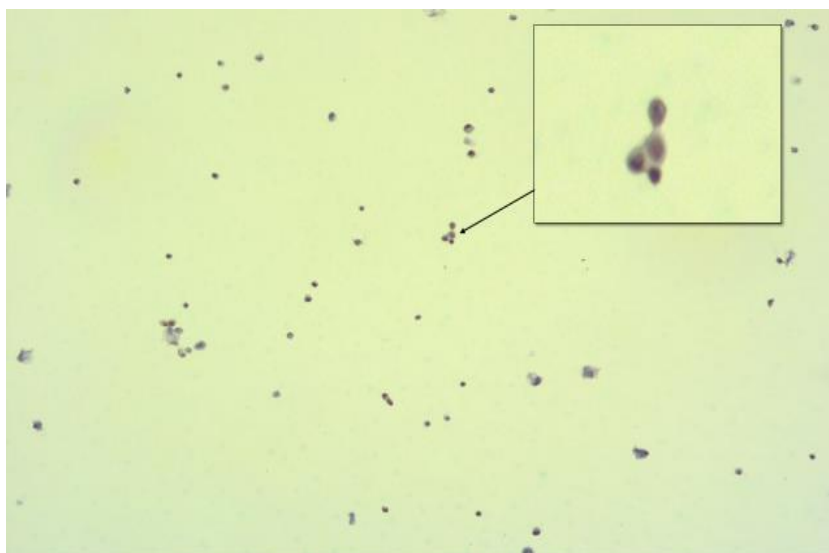
Primarno protutijelo	Primarna pasaža	Sekundarna pasaža
Citokeratin 14	80,8%	93,5%
Citokeratin 19	0%	0%
Ki-67	29,5%	22,2%
p63	61,5%	38,2%
Vimentin	0%	0%

U primarnoj pasaži bio je karakterističan najveći broj matičnih stanica koje su bile vrlo male, imale malu jezgru i oskudnu citoplazmu. Primarna kultura ujedno je sadržavala i manji ukupni broj stanica jer nije prošlo dovoljno vremena za njihovo razmnožavanje. U sekundarnoj pasaži je mnogo stanica ušlo u diferencijaciju, a bile su prepoznatljive po svojoj veličini te obilnijoj citoplazmi u odnosu na jezgru za razliku od matičnih stanica. Biljeg CK14 je prisutan u citoplazmi mitotski aktivnih stanica bazalnog porijekla, a u testiranoj suspenziji primarne i sekundarne pasaže bilo je 80 - 95% stanica pozitivnih na biljeg CK14 (Slika 19). Niti jedna stanica nije pokazivala vimentin, biljeg mezenhimalnih stanica, čime sam dokazala da su u kulturi uzgojene samo epitelne stanice.



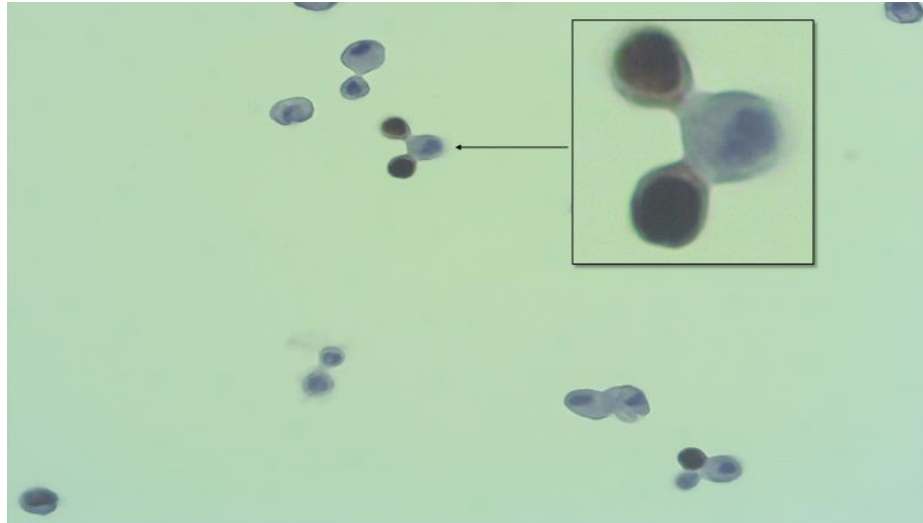
Slika 19. Sekundarna pasaža suspenzije keratinocita obilježena primarnim protutijelom citokeratin 14. Vidljivo smeđe citoplazmatsko obojenje unutar pojedinačnih stanica (ZeissAxiostar Plus, 100x)

Biljeg p63 se nalazi unutar jezgre, a njime sam dokazala prisutnost epidermalnih matičnih stanica koje nakon diobe ulaze u diferencijaciju keratinocita (Slika 20). Iz rezultata je vidljivo da je u primarnoj pasaži bilo prisutno čak 61,5% matičnih stanica koje su ušle u diferencijaciju dok su u sekundarnoj pasaži nakon 14 dana kultiviranja keratinocita još uvijek postojale stanice pozitivne na p63, njih 38,2%.



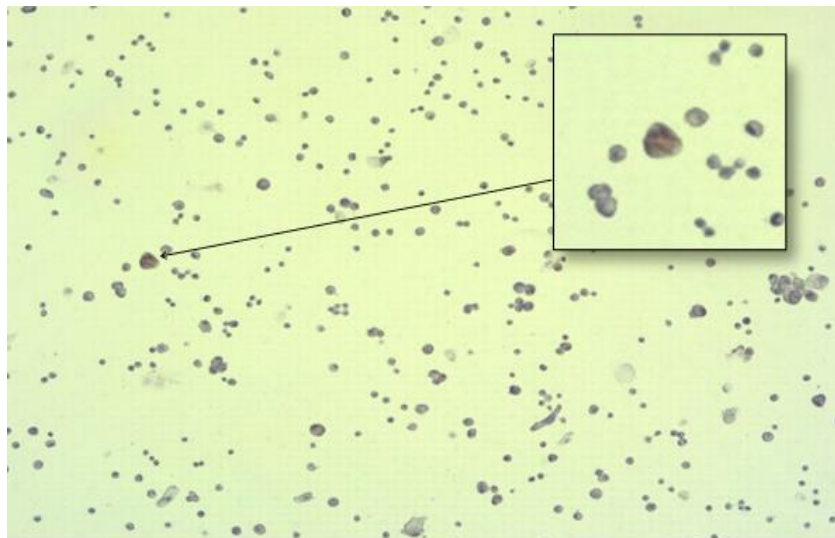
Slika 20. Primarna pasaža suspenzije keratinocita obilježena primarnim protutijelom p63. Vidljivo smeđe obojenje jezgre (ZeissAxiostar Plus, 400x)

Proliferacijski biljeg Ki-67 se također nalazi u jezgri i sve stanice koje su proliferirale su pokazale smeđe obojenje jezgara (Slika 21). U primarnoj pasaži više stanica je bilo u proliferaciji nego u sekundarnoj (29,5% u odnosu na 22,2%).



Slika 21. Primarna pasaža suspenzije keratinocita obilježena s Ki-67. Vidljivo smeđe obojenje jezgre (ZeissAxiostar Plus, 400x)

Keratin 19 se pojavio u kasnijim fazama diferencijacije epitelnih stanica, međutim ne i u potpuno zrelih keratinocitima. Kao što se vidi iz ovih rezultata, stanice u primarnoj i sekundarnoj pasaži nisu bile pozitivne na citokeratin 19, a bila je vidljiva tek poneka pozitivna stanica u sekundarnoj pasaži (Slika 22).



Slika 22. Sekundarna pasaža suspenzije keratinocita obilježena primarnim protutijelom citokeratinom 19. Vidljivo je smeđe obojenje pozitivne stanice (ZeissAxiostar Plus, 100x)

4.7. Rezultati endotoksin testa

Endotoksin test sam provela na hranjivom staničnom GM mediju iz bočice prve pasaže pomoću PTS uređaja (Tablica 7). Koncentracija bakterijskih endotoksina u uzorku s obzirom na faktor razrjeđenja iznosila je < 0,250 EU/mL, što je unutar prihvatljive vrijednosti.

Tablica 7. Rezultati endotoksin testa

Datum i vrijeme provođenja endotoksin testa	09-03-20, 16:09:13
Broj uređaja	1203
Temperatura uređaja	37 °C
Metoda	KX-122
Lot broj uloška	9819131
Kalibracijski kod uloška	421161704794
Rang osjetljivosti uloška	0,5-0,005
Reakcijsko vrijeme	Sec: 211-1017
Razrjeđenje	50
Lot broj uzorka	GM Ožujak 20/4
Identifikacija uzorka	20KCI 1
Koncentracija bakterijskih endotoksina u uzorku uzimajući u obzir faktor razrjeđenja	< 0,250 EU/mL
Koeficijent varijacije vremena reakcije uzorka za utore 1&3	0.0%
Koeficijent varijacije vremena reakcije spikea za utore 2&4	0,119 EU/mL
Koeficijent varijacije vremena reakcije spikea za utore 2&4	1,7%
Postotak otkrivenog spikea	177%
Prolaznost testa	prošao

4.8. Detekcija prisutnosti *Mycoplasma* spp.

Analiza prisutnosti *Mycoplasma* spp. je provedena u Bolnici za zarazne bolesti „dr. Fran Mihavljević“ u Zagrebu na 10 µL izolirane DNA. Odsutnost bakterije *Mycoplasma* spp. je provjerena RT – PCR analizom i utvrđeno je da niti u jednom testiranom uzorku suspenzije 3T3 i keratinocita nije bilo prisutnih kolonija (Tablica 8). Zbog svih negativnih rezultata nisam uklonila niti jednu kulturu stanica prilikom izrade ATMP terapije keratinocita u suspenziji.

Tablica 8. Rezultati RT - PCR analize stanične kulture 3T3 stanica *Mycoplasma* spp.

Kod uzorka	Datum	Rezultati
3T3 p#7	25.02.2020.	NEGATIVNO
3T3 p#6	25.02.2020.	NEGATIVNO
20 KC 1 p#0 (1)	28.02.2020.	NEGATIVNO
20 KC 1 p#0 (2)	28.02.2020.	NEGATIVNO
20 KC 1 p#3 LZKK (1)	24.06.2020.	NEGATIVNO

4.9. Rezultati mikrobiološke analize

Potencijalna kontaminacija zraka, kontaktnih površina, prstiju i odjeće djelatnika ili drugih komponenti prilikom izrade suspenzije keratinocita mogla bi rezultirati kontaminacijom samog lijeka za naprednu terapiju što bi spriječilo njegovu kliničku primjenu i produžilo oporavak pacijenta. Svi testirani parametri bili su sterilni prilikom uzorkovanja kroz čitavo vrijeme uzgoja kulture keratinocita (Tablica 9 i 10).

Tablica 9. Mikrobiološka analiza hranjivog staničnog FM medija koji je bio u kontaktu s 3T3 stanicama.

Kod uzorka	Datum slanja uzorka	Vrsta mikroorganizma
3T3 p#5	24.01.2020.	STERILNO
3T3 p#6	24.02.2020.	STERILNO
3T3 p#6	25.02.2020.	STERILNO
3T3 p#9 (1/3)	22.05.2020.	STERILNO

Tablica 10. Mikrobiološka analiza hranjivog staničnog GM medija koji je bio u kontaktu s keratinocitima i 3T3 stanicama.

Kod uzorka	Datum slanja uzorka	Vrsta mikroorganizma
20 KC 1 p#0 (1)	23.02.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#0 (2)	23.02.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#0 (1)	28.02.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#0 (2)	02.03.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#1 (1/1)	04.03.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#1 (1/3)	04.03.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#1 (2/2)	08.03.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#2 (1/1/2)	08.03.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#2 (1/2/5)	08.03.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#2 (1/4/2)	08.03.2020.	STERILNO
20 KC 1 p#3 LZKK (1)	24.06.2020.	STERILNO

5. RASPRAVA

Približno dva milijuna ljudi godišnje doživi teške opekline koje je potrebno klinički zbrinuti. U proteklih nekoliko godina smrtnost se znatno smanjila zbog napretka u medicini i tehnologiji (Jeschke i sur. 2018; Verbeken i sur. 2020). Duboke dermalne opekline (II B°) i subdermalne opekline (III°) tretiraju se kirurški kako bi se uklonila nekrotična koža i izbjegla sepsa. Oba tipa opekline nemaju mogućnost spontanog zarastanja rana jer zahvaćaju dijelove dermisa u kojima se nalaze keratinocitne matične stanice potrebne za ponovnu epitelizaciju (Hettiaratchy i Dziewulski 2004). Keratinocitne matične stanice se dijele asimetričnom diobom, što osigurava nastanak novih matičnih stanica i stanica koje se diferenciraju i stratificiraju te tako obnavljaju ozlijeđeno područje kože kod opekline ili rana koje teško zacjenjuju. Kada zbog dubine opekline nedostaju matične stanice potrebno ih je dovesti na ranu autolognim keratinocitnim transplantatima koji se primjenjuju kao tkivni presadci ili u suspenziji (Rousselle i sur. 2019). Prije kliničke primjene ključna je provjera kontrole kvalitete koja osigurava sigurnost i efikasnost ove inovativne napredne terapije (Hanna i sur. 2016).

Postoje zamjenske kože koje su komercijalno dostupne i one koje se proizvode unutar bolnice specifično za pojedinog pacijenta pod nazivom „bolničko izuzeće“ (Verbeken i sur. 2020). U Republici Hrvatskoj postoji Banka tkiva i stanica u Zavodu za transfuzijsku i regenerativnu medicinu, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice koja osigurava dostupnost uzgojenih *in vitro* autolognih epidermalnih transplantata ili keratinocita u suspenziji ovisno o potrebama liječenja i stupnju opekline. Banka tkiva i stanica je organizirana klinička jedinica u kojoj se obavljaju djelatnosti prikupljanja, uzimanja, obrade, očuvanja, pohrane i raspodjele ljudskih tkiva i stanica namijenjenih za kliničku primjenu. Za hitnu uporabu i primarno prekrivanje rana koristi se kadaverična ili sintetska koža jer je za izradu autologne terapije keratinocita potrebno osam dana ili tri tjedna, ovisno o metodi primjene (Corte i sur. 2012). Kadaverična koža je koža preminulih darivatelja koja je uzeta, testirana, obrađena, pohranjena i raspodijeljena u skladu sa trenutno važećim zakonima, smjernicama i direktivama u području tkivnog bankarstva (Direktiva 2015/566 n.d.). Kod kliničke primjene kadaverične kože pacijentu se kirurški uklanja opečena koža i na ranu se stavlja glicerolizirana ili krioprezervirana kadaverična koža koja sprječava danji gubitak vode i ulazak patogena. Takva koža nije trajno rješenje nego prva pomoć dok se priprema dovoljna količina autolognih keratinocita.

Ukoliko u banci tkiva i stanica nema zaliha alogene kože ili bolnica ne provodi licencirane metode zbrinjavanja teško opečenih pacijenata, gotove terapije ili zamjenska koža se naručuju od banaka izvoznica unutar EU nakon procjene potrebne količine kože (cm²). Banka tkiva Banc De Sang i Teixits (Barcelona, Španjolska) je banka izvoznica jer zbog učinkovite mogućnosti pohrane i validacije metoda posjeduje zalihe kadaverične kože koje dostavlja ostalim bankama Europske unije prema potrebama i narudžbama. Banka izvoznica osigurava sve korake dostave kadaverične kože ili alogenih presađaka, osigurava dostupnost zatražene količine kože i transport.

U Zavodu za transfuzijsku i regenerativnu medicinu organiziran je poseban Odjel kontrole kvalitete u transfuzijskoj medicini, tkivnom bankarstvu i staničnoj terapiji unutar koje se nalazi Laboratorij za kontrolu kvalitete, istraživanje i razvoj. Kontrola kvalitete podrazumijeva mikrobiološko uzorkovanje gotovih reprezentativnih uzoraka i medija u kojima se uzgajala stanična kultura. Također se provode testovi utvrđivanja postotka vijabilnosti keratinocita kroz pasaže. Prema DeGraffenried i Isseroff (2001) prosječna vijabilnost stanica iznosi ~ 90%, a u ovom diplomskom radu utvrdila sam vijabilnost stanica > 95%. Kao dio kontrole kvalitete pratila sam broj stanica u kultivacijskoj zdjelici. Tijekom uzgoja keratinocita provjeravala sam i pratila potencijal stvaranja kolonija (engl. *Colony Forming Efficiency*, CFE) to jest postotak holoklonova, meroklonova i paraklonova. Međutim test CFE nije jedini test kojim se potvrđuje i predviđa potencijal stvaranja kolonija te se rade dodatne analize pomoću biljega p63 kojim se potvrđuje prisutnost matičnih stanica (Nieto-Nicolau i sur. 2016). Jedan od nužnih testova je i test imunocitokemije kojim sam provjeravala postotak matičnih i proliferacijskih stanica u staničnoj suspenziji keratinocita. Kao dio kontrole kvalitete poslala sam uzorke na analizu u Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu te su oni protočnom citometrijom analizirali ostatne 3T3 stanice unutar suspenzije keratinocita. Utvrdila sam 1,36% ostatnih 3T3 stanica, što je unutar dopuštenih vrijednosti. Prisutnost *Mycoplasma* spp. u staničnoj kulturi može izazvati infekcije kod pacijenta nakon kliničke primjene te je od iznimne važnosti analizirati uzorke stanične kulture. Zbog građe ove bakterije koja ne posjeduje staničnu stijenku, *Mycoplasma* spp. prolazi kroz filtere promjera pore ≤ 0,2 μm zbog čega postoji dodatna opasnost od kontaminacije ostalih staničnih kultura kao i cijelog laboratorija. *Mycoplasma* spp. potrebno je detektirati pomoću RT - PCR metode koja je preporučena od međunarodne farmakopeje Ph. Eur. 2.6.7 kao visoko senzitivna metoda detekcije (EDQM 2019; Pamies i sur. 2017). Iz tog razloga sam uzorkovala hranjivi medij kako

bih utvrdila odsutnost *Mycoplasma* spp. te je korišten RT-PCR kako bi izbjegla lažno negativne ili lažno pozitivne rezultate. Analiza odsutnosti *Mycoplasma* spp. je obavljena u Zaraznoj bolnici „dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Kako bi stanična kultura bila u potpunosti sigurna, provjerava se mikrobiološka sterilnost. Postoji mogućnost kontaminacije zbog prisutnosti multirezistentnih bakterijskih sojeva kao što su *Acinetobacter*, *Staphylococcus* i *Proteus* koji se mogu naći na ljudskoj koži pacijenata koji borave u bolnici. Kod uzgoja keratinocita dobivenih biopsijom kože pacijenata koji imaju spomenute bakterijske sojeve može doći do razvoja kontaminacija u staničnim kulturama (Dragúňová i sur. 2013). Zbog mikrobiološke sigurnosti uzorkovala sam hranjive medije, te uzimala otiske radne površine, mikrobiološkog kabineta te prste ruku. Dodatno sam uzorkovala zrak u laboratoriju i vodu iz CO₂ inkubatora te ih poslala u HZTM u Zagrebu kako bi terapija bila u potpunosti sigurna za pacijenta.

Kao alternativni način zbrinjavanja opekline brojne biotehnoške kompanije proizvode komercijalno dostupnu zamjenska kožu koja često ima lošu vaskularizaciju te dovodi do nekroze, a ponekad i do stvaranja malignih tvorevina (Vig i sur. 2017). Zbog visokih troškova i brojnih nedostataka komercijalne kože, najbolja terapija pri liječenju dubokih opekline je napredna terapija autolognim keratinocitima. Naprednu terapiju je moguće primijeniti u suspenziji ili u obliku tkivnih presađaka (De Luca i sur. 2019). Navedene metode imaju svoje prednosti i nedostatke, a liječnik odabire način primjene. Prednost primjena keratinocita u suspenziji u odnosu na ostale metode je njezina jednostavnija klinička primjena i kraće vrijeme kultivacije. Terapija suspenzijom keratinocita je osigurala dovođenje keratinocitnih matičnih stanica na opečeno područje gdje su se razmnožile i stvorile epidermis.

Zbog strogih zakonskih regulativa danas se primjenjuje vrlo mali broj naprednih terapija koje uključuju liječenje pomoću stanične kulture keratinocita te je ključno da se regulative promjene kako bi terapija bila dostupnija i jeftinija pacijentima diljem svijeta (Verbeken i sur. 2020). U Hrvatskoj se ne proizvode komercijalne terapije, njihova primjena je moguća nakon uvoza iz inozemstva, no cijena takve terapije je vrlo visoka. Primjena personalizirane terapije keratinocitima u suspenziji po principu bolničkog izuzeća odobrena je i licencirana od Ministarstva zdravstva i ulazi u osnovno zdravstveno osiguranje u Republici Hrvatskoj. Cijena je definirana preko Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje i iznosi za 65,66 kn za 1 cm² uzgojenih keratinocita bilo da se primjenjuju kao epidermalni presađak ili u suspenziji. Iako postoje komercijalno dostupne zamjenske kože, kao što je Integra, još uvijek je potrebna i klinička primjena autolognih keratinocita.

Bolničko izuzeće omogućuje široku dostupnost prijeko potrebne terapije kojoj je osnovna svrha spašavanje života teško opečenih pacijenata. Napredna terapija kao što je suspenzija keratinocita je dostupna svim pacijentima u Hrvatskoj u kliničkim bolnicama koje imaju odjele za zbrinjavanje teško opečenih pacijenata bez obzira na socioekonomski status, a sterilan uzgoj i primjena omogućuju potpun oporavak pacijenata.

6. ZAKLJUČCI:

- 1) Odredila sam sljedeće indikatore kontrole kvalitete:
 - a) prije kliničke primjene testirala sam uzorke kulture keratinocita te potvrdila porast stvaranja kolonija u prvoj i drugoj pasaži. Osim veće klonogeničnosti, uočila sam i veći broj holoklonova i meroklonova kod keratinocita u prvoj u odnosu na drugu pasažu
 - b) vijabilnost testiranih stanica bila je iznad 95%
 - c) udio 3T3 stanica iznosio je svega 1,36% od ukupnog broja analiziranih stanica
 - d) koncentracija bakterijskih endotoksina u staničnim kulturama iznosila $< 0,250$ EU/mL
 - e) testovi detekcije *Mycoplasma* spp. u staničnim kulturama bili su negativni
 - f) mikrobiološki testovi kontrole kvalitete na bakterije, plijesni i gljivice potvrdili su potpunu sterilnost svih staničnih medija prilikom izrade keratinocita u suspenziji
 - g) udio keratinocita u pasažama bio je pozitivan na biljeg prisutnost epitelnih stanica bazalnog porijekla (CK14) i iznosio je 80% - 93,5%, dok je biljeg zrelih diferenciranih keratinocita (CK19) kao i biljeg mezenhimalnih stanica bio negativan. Udio matičnih stanica (p63) u staničnim kulturama kroz pasaže iznosio je od 38,2% -61,5%, dok je proliferacijski biljeg (Ki-67) iznosio 22,2% - 29,5%.

Stanice su nakon kontrole kvalitete uzgajane 20 dana do kliničke primjene i nakon toga primijenjene na pacijentu čija je opekлина uspješno izliječena. Svrha kontrole kvalitete je da svaki pacijent primi stanice koje su u potpunosti sigurne.

7. LITERATURA

- Akter F., Ibanez J., Bulstrode N. (2016): Skin Engineering. *Tissue Eng. Made Easy* **4**: 18–27.
- Alonso L., Fuchs E. (2003): Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 11830–11835.
- Barrandon Y., Grasset N., Zaffalon A., Gorostidi F., Claudinot S., Droz-Georget S.L., Nanba D., Rochat A. (2012): Capturing epidermal stemness for regenerative medicine. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**: 937–944.
- Barrandon Y., Green H. (1987): Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 2302–2306.
- Blair M.J., Jones J.D., Woessner A.E., Quinn K.P., Al B.E.T. (2019): Skin structure – function relationships and the wound healing response to intrinsic aging. **00**: 1–17.
- Carvalho M., Sepodes B., Martins A.P. (2017): Regulatory and scientific advancements in gene therapy: State-of-the-art of clinical applications and of the supporting european regulatory framework. *Front. Med.* **4**: 1–18.
- Chua A.W.C., Khoo Y.C., Tan B.K., Tan K.C., Foo C.L., Chong S.J. (2016): Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. *Burn. Trauma* **4**: 1–14.
- Corte P. De, Verween G., Verbeken G., Rose T., Jennes S., Coninck A. De, Roseeuw D., Vanderkelen A. (2012): Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes : improved performance , usability , quality and safety. **13**: 175–189.
- Currie L.J., Sharpe J.R., Martin R. (2001): Special topic the use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements. *Reconstr. Surg* **108**: 1713–1726.
- Dai C., Shih S., Khachemoune A. (2020): Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. *J. Dermatolog. Treat.* **31**: 639–648.
- DeGraffenried L.A., Isseroff R.R. (2001): Wound dressings alter the colony-forming efficiency of keratinocytes in cultured sheet grafts. *Cell Transplant.* **10**: 749–754.

Direktiva 2003/63/EZ DIREKTIVA KOMISIJE 2003/63/EZ od 25. lipnja 2003. o izmjeni Direktive 2001/83/EZ Europskog parlamenta i Vijeća o zakoniku Zajednice o lijekovima za humanu primjenu.

Direktiva 2004/23/EZ DIREKTIVA 2004/23/EZ EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 31. ožujka 2004. o utvrđivanju standarda kvalitete i sigurnosti za postupke darivanja, prikupljanja, testiranja, obrade, čuvanja, skladištenja i distribucije tkiva i stanica.

Direktiva 2015/566 DIREKTIVA KOMISIJE (EU) 2015/566 od 8. travnja 2015. o provedbi Direktive 2004/23/EZ s obzirom na postupke provjere ekvivalentnosti standarda kvalitete i sigurnosti uvezenih tkiva i stanica.

Dragúňová J., Kabát P., Koller J. (2013): Skin explant cultures as a source of keratinocytes for cultivation. *Cell Tissue Bank*. **14**: 317–324.

Drexler H.G., Uphoff C.C. (2002): Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* **39**: 75–90.

Eder C., Wild C. (2019): Technology forecast: advanced therapies in late clinical research, EMA approval or clinical application via hospital exemption. *J. Mark. Access Heal. Policy* **7**: 1–14.

EDQM (2019). Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application. **4**: .

EMA, CAT (2018). Scientific recommendation on classification of advanced therapy medicinal products Article 17 – Regulation (EC) No 1394/2007. **2**.

Esteban-Vives R., Young M.T., Ziembicki J., Corcos A., Gerlach J.C. (2016): Effects of wound dressings on cultured primary keratinocytes. *Burns* **42**: 81–90.

Fariba M., Akram A. (2017): Skin substitutes; an updated review of products from year 1980 to 2017. *J. Appl. Biotechnol. Reports* **4**: 615–623.

Fredriksson C., Kratz G., Huss F. (2008): Transplantation of cultured human keratinocytes in single cell suspension: A comparative in vitro study of different application techniques. *Burns* **34**: 212–219.

Gálvez P., Clares B., Bermejo M., Hmadcha A., Soria B. (2014): Standard requirement of a

- microbiological quality control program for the manufacture of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Stem Cells Dev.* **23**: 1–10.
- Guimarães C.F., Gasperini L., Marques A.P., Reis R.L. (2020): The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nat. Rev. Mater.* **5**: 351–370.
- Hanna E., Rémuzat C., Auquier P., Toumi M. (2016): Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *J. Mark. Access Heal. Policy* **4**: 1–14.
- Hettiaratchy S., Dziewulski P. (2004): Pathophysiology and types of burns. *Point Vet.* **49**: 32–35.
- Hirsch T., Rothoefl T., Teig N., Bauer J.W., Pellegrini G., Rosa L. De, Scaglione D., Reichelt J., Klausegger A., Kneisz D., Romano O., Seconetti A.S., Contin R., Enzo E., Jurman I., Carulli S., Jacobsen F., Luecke T., Lehnhardt M., Fischer M., Kueckelhaus M., Quaglino D., Morgante M., Bicciato S., Bondanza S., Luca M. De (2017): Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* **551**: 327–332.
- Horst B. ter, Chouhan G., Moiemmen N.S., Grover L.M. (2018): Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **123**: 18–32.
- Iglesias-López C., Agustí A., Obach M., Vallano A. (2019): Regulatory framework for advanced therapy medicinal products in Europe and United States. *Front. Pharmacol.* **10**: 1–14.
- Izvešće komisije Europskog parlamenta i Vijeća IZVJEŠĆE KOMISIJE EUROPSKOM PARLAMENTU I VIJEĆU u skladu s člankom 25. Uredbe (EZ) br. 1394/2007 Europskog parlamenta i Vijeća o lijekovima za naprednu terapiju i o izmjeni Direktive 2001/83/EZ i Uredbe (EZ) br. 726/2004.
- Jeschke M.G., Shahrokhi S., Finnerty C.C., Branski L.K., Dibildox M. (2018): Wound coverage technologies in burn care: established techniques. *J. Burn Care Res.* **39**: 313–318.
- Kanapathy M., Hachach-Haram N., Bystrzonowski N., Connelly J.T., O’Toole E.A., Becker D.L., Mosahebi A., Richards T. (2017): Epidermal grafting for wound healing: a review on the harvesting systems, the ultrastructure of the graft and the mechanism of wound healing. *Int. Wound J.* **14**: 16–23.

- Kim H.S., Sun X., Lee J.H., Kim H.W., Fu X., Leong K.W. (2019): Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **146**: 209–239.
- Klama-Baryła A., Kitala D., Łabuś W., Kraut M., Glik J., Nowak M., Kawecki M. (2018): Autologous and allogeneic skin cell grafts in the treatment of severely burned patients: retrospective clinical study. *Transplant. Proc.* **50**: 1–7.
- Li Z., Maitz P. (2018): Cell therapy for severe burn wound healing. *Burn. Trauma* **6**: 1–10.
- Luca M. De, Aiuti A., Cossu G., Parmar M., Pellegrini G., Robey P.G. (2019): Advances in stem cell research and therapeutic development. *Nat. Cell Biol.* **21**: 801–811.
- Ma C.C., Wang Z.L., Xu T., He Z.Y., Wei Y.Q. (2020): The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. *Biotechnol. Adv.* **40**: 1–25.
- McGrath J.A., Eady R., Pope F.M. (2004): Anatomy and organization of human skin. *Rook's Textb. Dermatology Eighth Ed.* **1**: 34–86.
- Nanba D., Toki F., Matsushita N., Matsushita S., Higashiyama S., Barrandon Y. (2013): Actin filament dynamics impacts keratinocyte stem cell maintenance. *EMBO Mol. Med.* **5**: 640–653.
- Nieto-Nicolau N., Martínez-Conesa E.M., Casaroli-Marano R.P. (2016): Limbal stem cells from aged donors are a suitable source for clinical application. *Stem Cells Int.* **2016**: 1–11.
- Niezgoda A., Niezgoda P., Nowowiejska L., Białecka A., Nska-jundziłł C.I. (2017): Properties of skin stem cells and their potential clinical applications in modern dermatology. **27**: 227–236.
- Pamies D., Bal-Price A., Simeonov A., Tagle D., Allen D., Gerhold D., Yin D., Pistollato F., Inutsuka T., Sullivan K., Stacey G., Salem H., Leist M., Daneshian M., Vemuri M.C., Mcfarland R., Coecke S., Fitzpatrick S.C., Lakshmiathy U., Mack A., Wang W.B., Yamazaki D., Sekino Y., Kanda Y., Smirnova L., Hartung T. (2017): Good cell culture practice for stem cells & stem-cell-derived models. *ALTEX* **34**: 1–38.

- Pastar I., Stojadinovic O., Yin N.C., Ramirez H., Nusbaum A.G., Sawaya A., Patel S.B., Khalid L., Isseroff R.R., Tomic-Canic M. (2014): Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv. Wound Care* **3**: 445–464.
- Pirnay J.P., Verween G., Pascual B., Verbeken G., Corte P. De, Rose T., Jennes S., Vanderkelen A., Marichal M., Heuninckx W., Vos D. De (2012): Evaluation of a microbiological screening and acceptance procedure for cryopreserved skin allografts based on 14 day cultures. *Cell Tissue Bank*. **13**: 287–295.
- Potten C.S., Booth C. (2002): Keratinocyte stem cells: A commentary. *J. Invest. Dermatol.* **119**: 888–899.
- Ramezankhani R., Torabi S., Minaei N., Madani H., Rezaeiani S., Hassani S.N., Gee A.P., Dominici M., Silva D.N., Baharvand H., Hajizadeh-Saffar E. (2020): Two decades of global progress in authorized advanced therapy medicinal products: an emerging revolution in therapeutic strategies. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**: 1–29.
- Rheinwald J.G., Green H. (1977): Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* **265**: 421–424.
- Rousselle P., Braye F., Dayan G. (2019): Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **146**: 344–365.
- Sheikholeslam M., Wright M.E.E., Jeschke M.G., Amini-Nik S. (2018): Biomaterials for skin substitutes. *Adv. Healthc. Mater.* **7**: 1–20.
- Tognetti L., Pianigiani E., Ierardi F., Perotti R., Lonardo A. Di, Rubegni P., Fimiani M. (2017): Current insights into skin banking : storage , preservation and clinical importance of skin allografts. **2017**: 41–56.
- Urciuolo F., Casale C., Imperato G., Netti P.A. (2019): Bioengineered skin substitutes: The role of extracellular matrix and vascularization in the healing of deep wounds. *J. Clin. Med.* **8**: 1–13.
- Uredba 1934/2007 UREDBA (EZ) br. 1394/2007 EUROPSKOG PARLAMENTA I VIJEĆA od 13. studenoga 2007. o lijekovima za naprednu terapiju i o izmjeni Direktive 2001/83/EZ i Uredbe (EZ) br. 726/2004.

- Verbeken G., Draye J., Fauconnier A., Vanlaere I., Huys I., Corte P. De, Pascual B., Delmotte N., Pierlot A., Rose T., Vos D. De, Pirnay J. (2020): The magistral preparation of advanced therapy medicinal products (ATMPs). *J. Surg. Pract.* **2(1)**: 1–7.
- Vig K., Chaudhari A., Tripathi S., Dixit S., Sahu R., Pillai S., Dennis V.A., Singh S.R. (2017): Advances in skin regeneration using tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **18**: 1–19.
- Zhao H., Chen Y., Zhang C., Fu X. (2016): Autologous epidermal cell suspension: a promising treatment for chronic wounds. *J. Tissue Viability* **25**: 50–56.

ŽIVOTOPIS

Osobne informacije:

Ime i prezime: Ivona Arić

Datum rođenja: 21.08.1996.

Obrazovanje:

2018 – 2021 Diplomski studij molekularne biologije

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

2015 – 2018 Preddiplomski studij biologije

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju

Titula: univ. bacc. biol.

2011 – 2015 Srednja škola Opća gimnazija Nova Gradiška

Praktično iskustvo:

Laboratorijska stručna praksa u Klinici za tumore, KBC Sestre Milosrdnice

Organizacija i sudjelovanje u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Tjedan mozga“ 2016/17

Organizacija i sudjelovanje u popularno-znanstvenoj manifestaciji „Noć biologije“ 2018/19

Terenska nastava iz zoologije i botanike

Ostale vještine

- jezici: hrvatski (materinji), engleski

- digitalne vještine: Microsoft Windows, MS Office

- vozačka dozvola B kategorije

- Osnovna glazbena škola "Mate Lovrak" Nova Gradiška (2004-2011)