

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Barbara DOVGAN

**KRIOPREZERVACIJA HUMANIH MEZENHIMSKIH
MATIČNIH CELIC IN TKIVA POPKOVNICE V
KOMBINACIJI KRIOPROTEKTANTA TREHALOZE
IN REVERZIBILNE ELEKTROPORACIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Barbara DOVGAN

**KRIOPREZERVACIJA HUMANIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH
CELIC IN TKIVA POPKOVNICE V KOMBINACIJI
KRIOPROTEKTANTA TREHALOZE IN REVERZIBILNE
ELEKTROPORACIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**CRYOPRESERVATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM
CELLS AND UMBILICAL CORD TISSUE WITH COMBINATION OF
CRYOPROTECTANT TREHALOSE AND REVERSIBLE
ELECTROPORATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2020

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 7. 7. 2015 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje znanosti o celici. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Damijan Miklavčič ter za somentorico viš. znan. sod. dr. Ariana Barlič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: zasl. prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor SERŠA

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Onkološki inštitut

Član: prof. dr. Marko KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 3. 12. 2020

Barbara DOVGAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	UDK 6:60.621(043.3)
KG	Trehaloza, krioprezervacija, elektroporacija, DMSO, humane mezenhimske matične celice, ASC, UC-MSK
AV	DOVGAN, Barbara univ. dipl. biokem.
SA	MIKLAVČIČ, Damijan (mentor), BARLIČ, Ariana (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študijski program Bioznanosti, znanstveno področje znanosti o celici
LI	2020
IN	KRIOPREZERVACIJA HUMANIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC IN TKIVA POPKOVNICE V KOMBINACIJI KRIOPROTEKTANTA TREHALOZE IN REVERZIBILNE ELEKTROPORACIJE
TD	Doktorska disertacija
OP	XII, 95 str., 2 pregl., 20 sl., 264 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Trehaloza je nestrupen disaharid, ki velja za zelo obetaven krioprotektant za krioprezervacijo celičnih produktov, namenjenih zdravljenju pacientov. V naši raziskavi smo preverjali učinkovitost kombinacije reverzibilne elektroporacije v prisotnosti različnih koncentracij trehaloze na zamrzovanje dveh tipov humanih matičnih celic: matičnih celic iz maščobnega tkiva (ASC) in matičnih celic iz tkiva popkovnice (UC-MSK). Z določanjem permeabilizacije membrane in viabilnosti celic smo določili vrednost 1,5 kV/cm kot najbolj primerno jakost električnega polja za učinkovit vnos trehaloze. Celice smo nato elektroporirali v prisotnosti različnih koncentracij trehaloze ter ugotovili, da je za uspešno krioprezervacijo, ki je primerljiva s standardnim postopkom z 10 % dimetil sulfoksidom (DMSO), potrebna vsaj 250 mM trehaloza. Pri zamrzovanju celic brez elektroporacije v prisotnosti 250 mM trehaloze smo dosegli le 10 % nižje vrednosti viabilnosti, ki pa niso bile statistično različne. Rezultati določanja znotrajcelične koncentracije trehaloze kažejo, da je za uspešno krioprezervacijo dovolj okrog 30–40 mM znotrajcelične koncentracije trehaloze. S preverjanjem celične morfologije, celične diferenciacije, izražanja stresnih genov ter izražanja genov povezanih z imuno-aktivacijo smo ocenili ali elektroporacija in krioprezervacija vplivata na celice. Ugotovili smo, da elektroporacija in krioprezervacija ne vplivata na celično morfologijo in sposobnost diferenciacije, saj so se vse testirane celice diferencirale tako v adipogeno kot osteogeno linijo. Pri testiranju celic na izražanje stresnega odziva smo ugotovili, da se celice na elektroporacijo in krioprezervacijo odzovejo s povišanjem izražanja nekaterih stresnih genov <i>sod2</i> in <i>hspa1a</i> . Kljub temu pa so še vedno sposobne izražati imunomodulacijske gene, <i>ido1</i> , <i>tsg6</i> in <i>il6</i> , ki jih povzroči simulirano vnetno okolje. Celice ASC in UC-MSK zamrznjeni v prisotnosti trehaloze tako izražajo podobne lastnosti kot celice zamrznjene z DMSO, trehaloza pa ne predstavlja dodatnega tveganja za paciente pri uporabi zamrznjenega celičnega produkta. Poskus zamrznitve tkiva popkovnice v prisotnosti 250 mM trehaloze in elektroporacije je bil neuspešen, medtem ko je bila zamrznitev tkiva popkovnice z 10 % DMSO uspešna.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Dn
DC	UDC 6:60.621(043.3)
CX	Trehalose, cryopreservation, electroporation, DMSO, human mesenchymal stem cells, ASC, UC-MS
AU	DOVGAN, Barbara
AA	MIKLAVČIČ, Damijan (supervisor), BARLIČ, Ariana (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field Cell Sciences
PY	2020
TI	CRYOPRESERVATION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND UMBILICAL CORD TISSUE WITH COMBINATION OF CRYOPROTECTANT TREHALOSE AND REVERSIBLE ELECTROPORATION
DT	Doctoral dissertation
NO	XII, 95 p., 2 tab., 20 fig., 264 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Trehalose, a nontoxic disaccharide, is a promising cryoprotective agent for medically applicable cells. In our study, the efficiency of combining reversible electroporation and trehalose for cryopreservation of two human mesenchymal stem cell types; adipose-derived stem cells (ASC) and umbilical cord-derived stem cells (UC-MS) was assessed. By optimization of cell permeabilization and viability parameters, 1.5 kV/cm of electric field was determined to successfully introduced trehalose into the cells. Cells were then electroporated in the presence of different extracellular trehalose concentrations. 250 mM extracellular trehalose was determined to be needed for successful cell cryopreservation that is comparable to results obtained by standard dimethyl sulfoxide (DMSO) cryopreservation protocol. Surprisingly, comparable viabilities were obtained in samples treated with or without electroporation in the presence of high extracellular trehalose concentration, where only 10 % lower viability was obtained in non-electroporated cells. At 250 mM extracellular trehalose concentration of about 30–40 mM intracellular trehalose concentration was shown to be sufficient for successful cryopreservation of the cells. To evaluate the impact of electroporation and cryopreservation on cells, cell morphology, cell differentiation, stress response and immune-activation related gene expressions were analyzed. Electroporation and cryopreservation did not affect cell morphology or cell differentiation since all tested samples were capable of adipogenic and osteogenic differentiation. Despite increased stress response, capacity of ASC and UC-MS to highly up-regulate immunomodulatory genes in simulated inflammatory environment was not affected. ASC and UC-MS cryopreserved in trehalose exhibited comparable characteristics to DMSO cryopreserved cells. Importantly, in comparison to DMSO, trehalose does not represent an additional risk for the patient upon cryopreserved cell product administration. Cryopreservation of umbilical cord tissue using electroporation in the presence of 250 mM trehalose was not successful. However, umbilical cord tissue was successfully cryopreserved using 10% DMSO.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 LASTNOSTI IN VRSTE MATIČNIH CELIC.....	4
2.1.1 Matične celice popkavnice	6
2.1.2 Matične celice maščobnega tkiva	7
2.2 ZGRADBA IN ZNAČILNOSTI CELIČNE MEMBRANE.....	8
2.3 METODA SHRANJEVANJA Z ZAMRZOVANJEM ALI KRIOPREZERVACIJA	9
2.3.1 Značilnosti krioprotektanta DMSO.....	10
2.3.2 Značilnosti krioprotektanta trehaloze.....	12
2.4 METODA PERMEABILIZACIJE MEMBRANE Z ELEKTROPORACIJO .	15
2.5 KRIPOREZERVACIJA TKIVA IZ POPKOVNICE	17
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 PRIPRAVA CELIČNIH KULTUR	20
3.2 PERMEABILIZACIJA CELIČNE MEMBRANE Z ELEKTROPORACIJO .	21
3.2.1 Elektroporacija	21
3.2.2 Permeabilizacija membrane	22
3.2.3 Celična viabilnost – test MTT	22
3.3 CELIČNA VIABILNOST PRED IN PO KRIOPREZERVACIJI CELIC	23

3.3.1	Elektroporacija celičnih suspenzij	23
3.3.2	Krioprezervacija celic	24
3.3.3	Celična viabilnost	24
3.3.3.1	Barvanje s tripan modrim.....	24
3.3.3.2	Test MTT.....	24
3.4	DOLOČANJE ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE TREHALOZE	25
3.4.1	Elektroporacija:	25
3.4.2	Krioprezervacija:	25
3.4.3	Določanje koncentracije znotrajcelične trehaloze	25
3.5	CELIČNA MORFOLOGIJA IN DIFERENCIACIJA	26
3.5.1	Adipogena diferenciacija	26
3.5.2	Osteogena diferenciacija	27
3.6	ANALIZA IZRAŽANJA STRESNIH GENOV	27
3.7	IZRAŽANJE GENOV Z AKTIVACIJO VNETNIH FAKTORJEV	28
3.8	ZAMRZOVANJE TKIVA POPKOVNICE Z ELEKTROPORACIJO IN TREHALOZO	29
3.9	STATISTIČNA ANALIZA	31
3.10	PRIPRAVA MEDIJEV	31
4	REZULTATI	33
4.1	PERMEABILIZACIJA CELIČNE MEMBRANE Z ELEKTROPORACIJO .	33
4.2	CELIČNA VIABILNOST PRED IN PO KRIOPREZERVACIJI CELIC Z UPORABO ZUNAJCELIČNE TREHALOZE	34
4.2.1	Viabilnost celic ASC z uporabo 250 mM in 400 mM trehaloze v pufru	34
4.2.2	Koncentracija zunajcelične trehaloze od 0 do 250 mM	35
4.3	DOLOČANJE ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE TREHALOZE	38
4.4	CELIČNA MORFOLOGIJA IN DIFERENCIACIJA	39
4.5	ANALIZA IZRAŽANJA STRESNIH GENOV	48
4.6	IZRAŽANJE GENOV Z AKTIVACIJO VNETNIH FAKTORJEV	50
4.7	ZAMRZOVANJE TKIVA POPKOVNICE Z ELEKTROPORACIJO IN TREHALOZO	52
5	RAZPRAVA	56
5.1	PERMEABILIZACIJA CELIČNE MEMBRANE Z ELEKTROPORACIJO .	56

5.2	CELIČNA VIABILNOST PRED IN PO KRIOPREZERVACIJI CELIC	56
5.3	DOLOČANJE ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE TREHALOZE	59
5.4	CELIČNA MORFOLOGIJA IN DIFERENCIACIJA	61
5.5	ANALIZA IZRAŽANJA STRESNIH GENOV	62
5.6	IZRAŽANJE GENOV Z AKTIVACIJO VNETNIH FAKTORJEV	64
5.7	ZAMRZOVANJE TKIVA POPKOVNICE	65
6	SKLEPI	67
7	POVZETEK	69
7.1	POVZETEK	69
7.2	SUMMARY	72
8	VIRI	74
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Slika 1: Tkivo popkovnice.....	7
Slika 2: Shematski prikaz poteka elektroporacije	15
Slika 3: Shematski prikaz nastanka por.....	16
Slika 4: Shema poteka poskusov	20
Slika 5: Shematski prikaz kivete za elektroporacijo.....	22
Slika 6: Permeabilizacija (%) in viabilnost (%) celic ASC in UC-MSC po elektroporaciji	33
Slika 7: Celična viabilnost (%) ASC določena s testoma barvanje s tripan modrim in MTT	35
Slika 8: Celična viabilnost (%) ASC in UC-MSC določena s testom tripan modro	36
Slika 9: Celična viabilnost (%) ASC in UC-MSC določena s testom MTT	37
Slika 10: Določanje znotrajcelične koncentracije trehaloze (mM) ASC in UC-MSC	39
Slika 11: Celična morfologija ASC	41
Slika 12: Celična morfologija UC-MSC	42
Slika 13: Adipogena diferenciacija celic ASC pred in po krioprezervaciji.....	44
Slika 14: Adipogena diferenciacija celic UC-MSC pred in po krioprezervaciji.....	45
Slika 15: Osteogena diferenciacija ASC pred in po krioprezervaciji (CP)	46
Slika 16: Osteogena diferenciacija UC-MSC pred in po krioprezervaciji (CP).....	47
Slika 17: Izražanje stresnih genov pri ASC in UC-MSC.	49
Slika 18: Izražanje imunomodulatornih genov pri celicah ASC in UC-MSC.....	51
Slika 19: Eksplanti tkiva pred krioprezervacijo	54
Slika 20: Eksplanti tkiva po krioprezervaciji	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: prisotnost rasti celic pri vzorcu tkiva D1: $E = 2 \text{ kV/cm}$	53
Preglednica 2: prisotnost rasti celic pri vzorcu tkiva D2: $E = 1,5 \text{ kV/cm}$	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ASC	matična celica iz maščobnega tkiva (angl. Adipose-derived Stem Cell)
DMEM/F12	Dulbeccov modificiran gojilni medij: hranilna mešanica F-12 (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium: nutrient mixture F-12)
DMSO	dimetil sulfoksid
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
bFGF	Bazični fibroblastni rastni dejavnik (angl. Basic Fibroblast Growth Factor); znana sta tudi druga dva sinonima, in sicer FGF2 in FGF- β
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
MMC	mezenhimska matična celica
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphat-buffered saline)
PI	propidijev jodid (angl. propidium iodide)
UC-MSC	mezenhimska matična celica iz tkiva popkovnice (angl. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell)

SLOVARČEK

Celična viabilnost	Parameter za merjenje celotne dejavnosti celične populacije.
Eksplant	Tehnika, s katero izoliramo celice iz koščka tkiva tako, da tkivo gojimo v kulturi, dokler iz njega ne začnejo izraščati celice.
Elektroporacija	Pojav, pri katerem se zaradi prisotnosti električnega polja začasno poveča prepustnost celične membrane (Lebar in sod., 1998).
Diferenciacija	Proces, v katerem manj specializirana celica pridobi lastnosti bolj specializiranih celic.
Konfluenca	Preraščenost dna gojilne posode s celicami. Če so celice konfluentne pomeni, da so popolnoma prerasle rastno površino gojilne posode.
Krioprezervacija	Postopek, pri katerem se ohranjajo celice in njihove funkcionalne lastnosti pri zelo nizkih temperaturah (pod $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pod $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ se metabolna aktivnost celic bistveno zniža, kjer se teoretično lahko ohranijo lastnosti in funkcija celic za nedoločen čas (Hunt, 2007).
Krioprotektant	Snov, v kateri zamrzemo celice pri postopku krioprezervacije. Celice zaščitijo pred poškodbami, ki nastanejo pri procesu zamrzovanja.
Matična celica	Nediferencirana celica, ki se s t.i. nesimetrično delitvijo lahko samoobnavlja, pri čemer nastane ena njej enaka hčerinska celica, hkrati pa druga, bolj diferencirana hčerinska celica. Ta ima manjši razvojni potencial, ker je bolj diferencirana (Rožman in Jež, 2009).
Mezenhimske matične celice (MMC)	So multipotentne matične celice, ki lahko delujejo imunomodulatorno in se <i>in vitro</i> lahko diferencirajo v različne tipe celic (celice kosti, hrustanca, mišic, maščobne celice, idr.). Nahajajo se v kostnem mozgu, popkovnici, maščobnem tkivu, idr. (Rožman in Jež, 2009). Angleški izraz je – mesenchymal stem cells (MSCs).
Osmolalnost	Število molov topljenca na kilogram raztopine (Osm/kg).
Pasaža	Presaditev celic iz prejšnje v novo celično kulturo. Ponavadi jo opravimo malo pred tem, ko celice v kulturi dosežejo konfluentno stanje.
Permeabilizacija	Prepustnost celične membrane, ki se spremeni, ko je začasno ali trajno porušena integriteta celične membrane, do česar pride zaradi npr. dovedenega električnega pulza ali prisotnosti detergentov.
Pinocitoza	Ali tekočinska endocitoza je vrsta endocitoze, pri kateri v celico vstopajo molekule, raztopljene v zunajcelični tekočini.
Primarna kultura	Celična kultura, ki jo nasadimo takoj po izolaciji celic iz biološkega vzorca.
Proliferacija	Podvojevanje celic in njihov razvoj.

Tripsinizacija Postopek, pri katerem z uporabo encima tripsina prekinemo medcelične stike in ločimo celice v celični kulturi od dna gojilne posode ali plošče ter pripravimo njihovo suspenzijo.

1 UVOD

Celične terapije so čedalje bolj razširjena metoda za zdravljenje različnih bolezni v sodobni medicini. Imajo velik terapevtski potencial v primerjavi z drugimi zdravili, saj vsebujejo celice, ki so živ dinamičen produkt, kar pomeni, da se v telesu odzovejo na svoje okolje: lahko potujejo na želeno mesto, lahko se razmnožujejo, diferencirajo ali spremenijo imunski odziv. Imajo zapleten mehanizem delovanja, ki še vedno ni popolnoma raziskan. Da lahko pripravimo varen in učinkovit celični produkt, se na tej poti srečamo z ovirami, med katere sodi tudi dolgotrajno shranjevanje celic in celičnih produktov. Krioprezervacija celičnih produktov ter tkiv predstavlja bistven korak pri čedalje bolj uspešnem zdravljenju s celičnimi terapijami.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Humane mezenhimske matične celice (MMC) lahko pridobimo iz različnih virov: maščobnega tkiva, popkovnice, kostnega mozga, placente in drugih tkiv. V zadnjem času se je uporaba MMC v medicini zelo razširila. Po svetu poteka veliko kliničnih študij (Kabat in sod., 2020; Brown in sod., 2019 Pak in sod., 2018; Česen in sod., 2018; Fang in sod., 2007; Lendeckel in sod., 2004), vključno z zdravljenjem COVID-19 (Golchin in sod., 2020). Za uporabo matičnih celic v terapiji moramo celice shraniti in zagotoviti kasnejšo možnost uporabe. Za dolgotrajno shranjevanje celic obstajajo različne metode, med katere spada liofilizacija (sušenje z zamrzovanjem, angl. »freeze-drying«), izsuševanje (sušenje na zraku, angl. »desiccation« ali »air-drying«) ter krioprezervacija, kjer se celice zamrzne pri ultra nizkih temperaturah, v parah tekočega dušika pri temperaturi nižji od $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Bissoyi in sod., 2016). Krioprezervacija je najpogostejša metoda za dolgotrajno shranjevanje celic. Njena uspešnost je odvisna od različnih parametrov, kot so postopek zamrzovanja in odtaljevanja celic ter vrsta krioprotektanta.

Priprava celičnega produkta mora ustrezati strogim zahtevam, da lahko zagotovimo varno in učinkovito zdravljenje. Smernice sledijo visokim standardom dobre proizvodne prakse oziroma GMP standardom (angl. »good manufacturing practice«), ki jih zahtevajo vladne institucije, kot sta Evropska agencija za zdravila (EMA) ali Uprava za hrano in zdravila v Združenih državah Amerike (FDA) ter lokalne državne institucije (Bedford in sod., 2018). Tovrstni celični produkti so največkrat pripravljene po naročilu za točno določenega pacienta, zato je sama priprava produkta časovno in finančno zelo zahtevna. Pomembno je tudi primerno shranjevanje pripravljenega celičnega produkta, predvsem v primeru večkratnih aplikacij zdravila. Ker je za kvaliteten celični produkt pomembna vitalnost celic (viabilnost, proliferacijske, imunomodulacijske sposobnosti), je zelo pomembno, kako se celice shrani za daljše časovno obdobje. Najbolj razširjena metoda trajnega shranjevanja celic in tkiv je krioprezervacija. Pri tem pa se uporabi snov – krioprotektant, ki zagotovi, da celice med zamrzovanjem ohranijo svoje funkcije in ne propadejo. Najbolj razširjen in

najbolj učinkovit krioprotektant je dimetil sulfoksid (DMSO) v kombinaciji z govejim serumom (FBS). Slaba lastnost DMSO-ja pa je, da je toksičen za celice in posledično za pacienta ter lahko izzove številne stranske učinke (Santos in sod., 2003; Weng in sod., 2020). Citotoksičnost 10 % DMSO-ja, ki je največkrat uporabljen v krioprezervaciji, narašča s temperaturo višjo od 4 °C (Wang in sod., 2007). To pomeni, da ga je potrebno po odmrzovanju čim prej odstraniti ali dovolj razredčiti, da ohranimo vitalne celice (Baust in sod., 2017; Fry in sod., 2015). V medicini je precej razširjeno zdravljenje z zamrznjenimi celičnimi pripravki, kar pomeni, da se pacientu takoj aplicira odtaljeni celični produkt, brez spiranja DMSO-ja, saj v primeru spiranja lahko izgubimo večje količine celic (Syme in sod., 2004). Ker so običajno ti pacienti v zelo slabem bolezenskem stanju, lahko DMSO še poslabša bolezensko stanje pacienta ali izzove nove zaplete (Zenhausern in sod., 2000; Grigg in sod., 2000; Higman in sod., 2000). Zato trendi uporabe DMSO-ja v krioprezervaciji težijo k njegovemu zmanjšanju ali nadomestitvi z drugimi krioprotektanti (Weng in sod., 2020; Awan in sod., 2020).

Drug kriterij pri pripravi celičnih produktov za zdravljenje, ki jih narekujejo smernice standarda GMP, je uporaba komponent, ki niso živalskega izvora. Kot najbolj razširjen medij za zamrzovanje, ki se ga dodaja poleg DMSO-ja, je fetalni goveji serum (FBS). Serum ščiti celice pred osmotskim šokom med postopkom krioprezervacije. V izogib uporabe govejega seruma kot komponente živalskega izvora, se pogosto uporablja tudi humani serum, humani serumski albumin ali trombocitni lizat. Pri vseh omenjenih komponentah je pomanjkljivost, da se razlikujejo iz šarže v šaržo in je težko zagotoviti konstantno sestavo medija (Ikebe in Suzuki, 2014).

V naši študiji smo se osredotočili na uporabo netoksičnega krioprotektanta, ki bi bil bolj varen za paciente, dovolj učinkovit, da ohrani želene funkcije celic po odmrzovanju, ne bi vseboval živalskih komponent in bi omogočal vzdrževanje sestave uporabljenih medijev. Kot nadomestek DMSO-ja smo uporabili netoksični sladkor trehalozo, ki deluje kot krioprotektant v kombinaciji z elektroporacijo, pri čemer elektroporacija omogoči prehajanje trehaloze v notranjost celice. Namen raziskave je, da ugotovimo ustrezne parametre za učinkovito krioprezervacijo celic in tkiv ter da ovrednotimo lastnosti celic po krioprezervaciji.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

- Na različnih celičnih tipih MMC optimizirati elektroporacijske parametre in optimalno koncentracijo trehaloze, ki bo zagotavljala dovolj visoko viabilnost celic.
- Preveriti učinkovitost elektroporacije in trehaloze na viabilnost zamrznjenih celic.
- Določitev znotrajcelične koncentracije trehaloze pred in po elektroporaciji.
- Preveriti funkcionalne sposobnosti adipogene in osteogene diferenciacije in imunomodulacije celic ter odziva na stres po tretiranju z elektroporacijo in trehalozo pred in po krioprezervaciji.

- Translacija optimiziranih parametrov na zamrzovanje tkiva popkovnice.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Z elektroporacijo povečamo vnos neprehajajočega krioprotektanta – trehaloze v humane matične celice v primerjavi z neporiranimi celicami.
- Z vnosom trehaloze v celice s postopkom reverzibilne elektroporacije dosežemo višje celično preživetje humanih matičnih celic po odmrzovanju v primerjavi z neporiranimi celicami.
- Z vnosom trehaloze v celice s postopkom reverzibilne elektroporacije dosežemo primerljivo celično preživetje humanih matičnih celic po odmrzovanju v primerjavi z zamrzovanjem / odmrzovanjem z DMSO.
- Z vnosom trehaloze v tkivo popkovnice s postopkom reverzibilne elektroporacije, ki poveča prepustnost tkiva, dosežemo boljše celično preživetje po odmrzovanju v primerjavi z zamrzovanjem / odmrzovanjem z DMSO.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LASTNOSTI IN VRSTE MATIČNIH CELIC

Matične celice (MC) so nediferencirane celice in imajo dve ključni lastnosti: samoobnavljanje in pluripotentnost. Njihova posebna lastnost je asimetrična delitev, pri čemer nastaneta dve neenaki celici. Ena je usmerjena predniška celica, ki se, usmeri in diferencira v določen tip celice, druga hčerinska celica pa je enaka materinski – matični celici (Rožman in Jež, 2010). Matične celice razdelimo na več razvojnih stopenj glede na njihove lastnosti. Univerzalna matična celica je oplojena jajčna celica, ki je totipotentna, kar pomeni, da se lahko razvije v katerokoli celico. Iz oplojene jajčne celice se razvije notranja celična masa. Tu se nahajajo pluripotentne embrionalne matične celice, ki se lahko razvijejo v večino diferenciranih celic. Iz njih pa se v različnih tkivih razvijejo odrasle matične celice, ki se lahko pretvorijo v različne, a med seboj sorodne vrste celic - to so multipotentne matične celice. Najmanj plastične matične celice pa so predniške celice, saj so unipotentne, lahko se pretvorijo le v eno vrsto celic, vendar imajo sposobnost samoobnavljanja, ki jih ločuje od nematičnih celic (Pappa in Anagnou, 2009). Embrionalne matične celice veljajo za najbolj matične celice z največjim potencialom, ki se jih lahko goji *in vitro*, saj naj bi imele neomejene sposobnosti delitve in diferenciacije. Vendar je zaradi njihovega neetičnega pridobivanja, ki vključuje uničenje človeškega zarodka, njihovo pridobivanje v večini držav etično sporno in posledično prepovedano.

Kot že omenjeno so matične celice odraslih tkiv bolj usmerjene z manjšo sposobnostjo diferenciacije in samoobnavljanja kot embrionalne, zato jih uvrščamo v skupino multipotentnih celic. Med odrasle matične celice spadajo mezenhimske matične celice (MMC), ki se *in vitro* diferencirajo v različne mezodermalne celične tipe (kostne, maščobne, hrustančne in mišične) (Brown in sod., 2019). Samoobnavljanje spada med glavne lastnosti celic MMC, vendar se v zadnjem času pojavlja več hipotez, da v *in vivo* razmerah celice MMC ne zgradijo tkiva, pač pa na mestu poškodbe ali bolezni s sproščanjem bioaktivnih faktorjev le signalizirajo drugim specializiranim celicam, da je tkivo potrebno obnoviti (Pittenger in sod., 2019; Meirelles in sod., 2009; Caplan in Dennis, 2006; Caplan in Correa, 2011). Celice MMC delujejo tudi imunomodulatorno na imunske celice, tako da zmanjšujejo imunski odziv limfocitov B in T ter s tem zavirajo imunske odzive in vnetne procese, ki jih sprožijo imunske celice (Pittenger in sod., 2019). V *in vitro* pogojih jih lahko osamimo in namnožujemo tako, da se pritrjujejo na plastično podlago. Od drugih celic, ki se tudi pritrjujejo na plastično podlago, se razlikujejo po značilni fibroblastni morfologiji in se med gojenjem zelo hitro razmnožujejo ter s tem prerastejo druge tipe celic (Wang in sod., 2005). Celice MMC ločimo od drugih celic tudi s pomočjo površinskih molekul, saj celice MMC na svoji površini izražajo antigenske molekule CD73, CD90, CD105 in CD166 in ne izražajo označevalcev za krvotvorne celice, kot so CD14, CD34 in CD45 (Dominici in sod., 2006).

Ime mezenhimske matične celice (MMC) (angl. Mesenchymal stem cells – MSCs) je staro že skoraj 30 let (Caplan, 1991). S tem terminom so želeli poimenovati razred humanih (Haynesworth in sod., 1992) oz. sesalčjih (Nakahara in sod., 1990) celic iz kostnega mozga in periosteuma (ovojnica, ki pokriva zunanjo plast kosti) (Caplan, 1988), ki jih lahko izoliramo in namnožimo v kulturi ter imajo sposobnosti diferenciacije v drug tip celic in/ali tkiv (kost, hrustanec, maščoba,...). Na podlagi njihovih sposobnost diferenciacije so definirali identifikacijo multipotentnih celic (Horwitz in sod., 2005). Zaradi velike želje po uporabi teh celic v medicinske namene, saj naj bi te celice lahko zgradile nadomestno tkivo v telesu, so v splošnem prevzeli termin matičnih celic (angl. »stem cells«). Ker pa se, kot že zgoraj omenjeno, v zadnjem času pojavlja vse več teorij, da v *in vivo* pogojih celice MMC ne zgradijo tkiva, pač pa na mestu poškodbe ali bolezni le signalizirajo drugim specializiranim celicam, da je tkivo potrebno obnoviti, bi bilo verjetno smiselno razmisliti o spremembi imena mezenhimskih matičnih celic (Caplan, 2017). Kot predlagane zamenjave se največkrat pojavljajo signalne celice (Caplan, 2010; Caplan, 2017) ali stromalne celice (Horwitz in sod., 2005; Le Blanc in sod., 2012; Caplan, 2017), da bi se lahko obdržala angleška kratica MSC (Caplan, 2017).

Celice MMC lahko pridobivamo iz različnih tkiv, kot je kostni mozeg (BMSC), maščobno tkivo (ASC), popkovnica (UC-MS), popkovnična kri, zobna pulpa, periferna kri, in druge (Hass in sod., 2011). Celice MMC se zaradi njihovih sposobnosti regeneracije poškodovanega tkiva, imunomodulacije in razmeroma lahke dostopnosti vedno več uporablja pri zdravljenju s celičnimi terapijami. Vse bolj razširjena je uporaba celic iz maščobnega tkiva in popkovnice, saj ju lahko pridobivamo v velikih količinah in veljata kot odpadni produkt: maščobno tkivo pri liposukciji in popkovnica pri porodu. Uporabljajo se za zdravljenje najrazličnejših bolezni (Brown in sod., 2019): za obnovo hrustanca (Pak in sod., 2018; Rada in sod., 2009; Song in sod., 2019), imunskih in avtoimunskih bolezni (Česen in sod., 2018; Puissant in sod., 2005; Fang in sod., 2007; Gao in sod., 2016), bolezni jeter in ledvic (Wang in sod., 2013; Song in sod., 2014), srčnih bolezni (Nascimento in sod., 2014) in drugih.

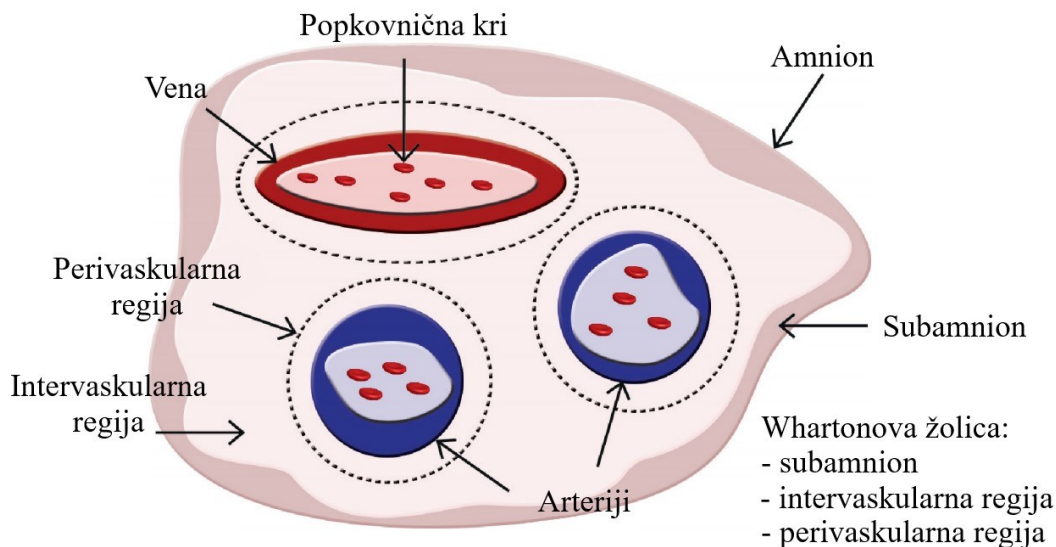
Zdravljenje imunskih bolezni s kortikosteroidi, imunosupresivi ali monoklonskimi protitelesi je zaradi odpornosti na zdravila, neodzivnosti nanje in njihovih neželenih učinkov precej omejeno. Zato se vse bolj širi uporaba alternativnih možnosti zdravljenja vnetnih in avtoimunskih bolezni. V zadnjem času je veliko pozornosti namenjene terapijam z regulacijo T celic (Treg) in T-celičnimi cepivi, vendar se zaradi zelo zahtevne priprave in posledično visoke cene kaže kot bolj obetavno zdravljenje s celicami MMC, saj te delujejo imunomodulatorno na imunske celice. Čeprav mehanizem delovanja celic MMC pri imunomodulaciji ni čisto razjasnjen, so znanstveniki mnenja, da celice MMC delujejo preko direktnih interakcij z imunskimi celicami prirojenega oziroma pridobljenega imunskega sistema (Regmi in sod., 2019). Ko so celice MMC izpostavljene provnetnem okolju, izločajo molekule citokine, ki lahko zavirajo zorenje monocitov v antigen-predstavljaljoče dendritične celice, spodbujajo prehod makrofagov iz M1 faze v M2, zavirajo proliferacijo in

aktivacijo B in T limfocitov ter spodbujajo klonsko ekspanzijo (angl. »clonal expansion«) regulacijskih T limfocitov (Leyendecker in sod., 2018; Regmi in sod., 2019). Tako med vnetnimi pogoji privzamejo provnetni fenotip, vendar vzdržujejo protivnetni fenotip, ko vnetja ni. Vzdrževanje ravnovesja med nasprotnimi stanji preprečuje prekomerno poškodbo tkiva in spodbudi njegovo obnavljanje (Bernardo in Fibbe, 2013).

2.1.1 Matične celice popkovnice

Kot že omenjeno med celice MMC spadajo celice, ki jih lahko pridobimo iz tkiv ob rojstvu otroka. To so popkovnica, amnijska membrana in placenta, ki jih imenujemo neonatalna tkiva. Celice pridobljene iz teh tkiv so precej podobne zgodnjim embrionalnim celicam, kar se odraža v izražanju površinskih označevalcev in diferenciacijskem potencialu (Hass in sod., 2011; Maslova in sod., 2015). Slabost teh celic pa je, da jih lahko pridobimo le enkrat v življenju, torej ob rojstvu otroka. Zato je pomembno, da jih lahko shranimo za morebitno kasnejšo uporabo.

Med neonatalnimi tkivi je popkovnica najbolj bogata s celičnim materialom in ima pretežno homogeno strukturo. Popkovnica je vez, ki povezuje plod z materjo. Preko žil v popkovnici plod pridobiva hranila in kisik za razvoj. Popkovnica je zgrajena iz zunanje amnijske membrane, sredino tkiva pa napolnjuje t.i. Whartonova žolica, kjer se nahaja večina mezenhimskih matičnih celic popkovnice (UC-MSC). Whartonova žolica je želatinasto vezivno tkivo, ki jo je prvi opisal Thomas Wharton leta 1656, od koder je leta 1991 McElreavey s sodelavci prvi izoliral MMC (McElreavey in sod., 1991). Zunanjo stran Whartonove žolice sestavlja subamnion, nato prehaja v intravaskularno regijo ter v notranjosti se nahaja perivaskularna regija. V perivaskularnem delu najdemo običajno dve arteriji in eno veno (Slika 1). Študije so pokazale, da različni predelki popkovnice vsebujejo različno gostoto celic UC-MSC ter celice UC-MSC izolirane iz različnih predelkov imajo različne lastnosti, kar se odraža v različnem izražanju označevalcev, proliferaciji in diferenciaciji. Največ celic se nahaja v perivaskularnem delu, medtem ko se število postopoma zmanjšuje proti zunanosti (Subramanian in sod., 2015; Stefańska in sod., 2020). Ker Whartonova žolica zavzema večino popkovnice, je tudi teh celic največ, zato jih med izolacijo najlažje pridobimo. Ker pa dejansko ne poznamo še vseh lastnosti posameznih celic v tkivu, bi bilo smiselno, da bi lahko shranili čim večji del popkovnice za kasnejšo uporabo (Yang in sod., 2015).



Slika 1: Tkivo popkovnice. Shematski prikaz prikazuje anatomske predele, vključno z Whartonovo žolico. (Povzeto po Vieira Paladino in sod., 2019).

Figure 1: Human umbilical cord structure. Schematic image showing umbilical cord anatomical compartments, including Wharton's jelly. (Adapted from Vieira Paladino et al., 2019).

2.1.2 Matične celice maščobnega tkiva

Maščobno tkivo prav tako predstavlja pomemben vir celic MMC. Je posebna vrsta vezivnega tkiva, ki ga gradijo t.i. adipociti, specializirani za shranjevanje maščobe. Maščobno tkivo je sestavljeno iz vlaken povezanih v mrežo, ki z adipociti tvorijo reženj, med katerim potekajo številne krvne žile. V samem maščobnem tkivu, ki izvira iz mezoderma, se poleg maščobnih celic nahaja veliko drugih fiziološko pomembnih celic: matične celice (ASC), preadipociti, fibroblasti, makrofagi, endotelijske celice, vaskularne gladkomišične celice in limfociti. Najpogosteje se celice ASC pridobi iz lipoaspirata (biološki material iz maščobe, maščobnega tkiva, krvi...) pridobljenega pri subkutani lipoaspiraciji, kjer velja za medicinski odpadek. Zato je pridobivanje precej bolj enostavno in etično, kot pa pridobivanje kostnega mozga (Miana in González, 2018). Vse do 80-ih let prejšnjega stoletja je bilo maščobno tkivo obravnavano zgolj kot toplotna izolacija telesa in zaloga energije. Nato pa so ugotovili, da je to največji endokrini organ (Mohamed-ali in sod., 1998; Friedman in Halaas, 1998) z metabolno zelo aktivnimi celicami, ki izločajo številne adipocitokine, citokine, hormone, transkripcijske in rastne faktorje in skupaj tvorijo sekretom. Sekretom predstavlja nabor proteinov organizma, ki se izločajo v zunajcelični prostor. Maščobno tkivo tako sodeluje v zapleteni mreži interakcij med endokrinim, živčnim in kardiovaskularnim sistemom (Miana in González, 2018; Rondinone, 2006). Nato pa je Zuk in sod. (2001) prvič poročal o matičnih celicah v maščobnem tkivu. Zaradi relativno lahke dostopnosti in količine

ter sposobnosti samoobnavljanja in hitre proliferacije, se je uporaba ASC v celičnih terapijah močno razširila (Pak in sod., 2018; Chu in sod., 2019; Rada in sod., 2009).

2.2 ZGRADBA IN ZNAČILNOSTI CELIČNE MEMBRANE

Celična membrana je membrana, ki ščiti celico pred zunanjimi vplivi in uravnava transport med celico in okolico. Sestavlja jo lipidni dvosloj, kjer so lipidi orientirani z nepolarnimi repi v notranjost dvosloja in polarno glavno navzven. V lipidni dvosloj so vpeti različni lipidi in proteini, njihova sestava oziroma delež lipidnega dvosloja in ostalih komponent pa se precej razlikuje pri različnih tipih celic ter se spreminja med različnimi stanji celičnega razvoja. Med membranskimi lipid so najbolj zastopani fosfolipidi, holesterol in glikolipidi. Fosfolipidi skupaj s holesterolom dajejo membrani rigidnost. Holesterol, ki je selektivno razporejen med fosfolipidi, preprečuje, da bi bili fosfolipidi razporejeni preblizu in vzdržujejo fluidnost membrane pri različnih temperaturah. Tako se membrana lahko obnaša kot tekočina ali gel ter prehaja iz ene v drugo obliko (angl. »fluid-gel phase transition«). Pri nižji temperaturi se membrana lahko obnaša kot gel – prehaja v »trdno« stanje, pri višji temperaturi pa je v tekoči obliki (Alberts in sod., 2002). Razporeditev lipidov ter proteinov vzdolž membrane ni homogena in se spreminja, pri čemer se lipidi in proteini gibljejo v različnih smereh. Tako lahko nastajajo strukture t.i. lipidnih raftov. Lipidni rafti so mesta v membrani, bogata s holesterolom, sfingolipidi in glikolipidi, ter naj bi igrali pomembno vlogo pri različnih transportnih in signalnih dogodkih (Pike, 2008).

Kljub temu, da lipidni dvosloj zagotavlja osnovno strukturo celični membrani, so membranski proteini tisti, ki so odgovorni za specifične naloge in dajejo posameznemu tipu celic oziroma celični membrani njene značilnosti in funkcionalne lastnosti. Obstajata dva tipa membranskih proteinov: periferni membranski proteini in integralni membranski proteini. Periferni ne prehajajo vse membrane, integralni pa so vklopljeni v membrano in jo prehajajo ter tako segajo na obe strani membrane. Integralni proteini imajo več različnih funkcij. Strukturni integralni proteini dajejo celici oporo in obliko. Receptorski integralni proteini sodelujejo pri komunikaciji hormoni, nevrottransmiterji in ostalimi signalnimi molekulami. Transportni integralni proteini delujejo kot membranski transporterji in tvorijo kanalčke in črpalke ter s tem zagotavljajo poti za transport specifičnih molekul skozi membrano, kar zagotavlja selektivno prepustnost celične membrane (Alberts in sod., 2002).

Prehajanje snovi skozi lipidni dvosloj je mogoče za manjše in bolj hidrofobne molekule (na primer kisik in ogljikov dioksid) v smeri koncentracijskega gradienta z difuzijo. Tudi manjše polarne molekule, kot sta voda in urea lahko prehajajo lipidni dvosloj, čeprav počasneje kot kisik in ogljikov dioksid. Nabite molekule in ioni (ne glede na velikost) ter ostale večje molekule pa skozi membrano ne morejo prosto prehajati. Nabite in večje molekule prehajajo skozi specifične kanalčke oziroma črpalke, ki omogočajo prehod le točno določenim molekulam ali skupini molekul. Pri prehajanju ionov in molekul skozi celično membrano ima velik pomen tudi transmembranski potencial. Transmembranski potencial je razlika v

električnem potencialu med notranjo in zunanjo stranjo celice, ki v normalnem stanju znaša med -40 mV do -80 mV. Ko celica doživi električni dražljaj, se transmembranski potencial spremeni in celici omogoča prehajanje ionov skozi ionske kanalčke v smeri elektrokemijskega gradienta, ionske črpalke pa s porabo energije v obliki ATP črpajo ione v nasprotni smeri elektrokemijskega gradienta (Alberts in sod., 2002).

Pravilno delovanje celične membrane je eden najpomembnejših dejavnikov za ohranjanje celične viabilnosti. Celično dehidracijo, ki jo povzroči zamrzovanje ali sušno okolje, regulirajo spremembe v organizaciji membranskih lipidov (Maurel, 1997; Wolfe in Bryant, 1999; Benga, 2009; Koster in Bryant, 2005). Načeloma je transport ionov in makromolekul skozi celično membrano počasnejši v primerjavi s transportom vode. Pri spremembi okolja, kot je dehidracija, se zato najhitreje odzove razporeditev vode v oziroma iz celice. Transport vode lahko poteka preko lipidov v membrani ali pa se hitrejša difuzija zgodi preko specifičnih vodnih kanalčkov, t.i. akvaporinov (Maurel, 1997; Benga, 2009). Pri razmerah počasnega sušenja in pri temperaturah nad tvorjenjem »steklaste oblike« (angl. »glassy state«) – brez tvorjenja kristalov, se molekularna mobilnost nenadoma ustavi. Difuzija vode se ustavi – vodni potencial pride v ravnovesje s topljencem, ki ne prehaja več celične membrane (Wolfe in Bryant, 1999). Enak proces se zgodi med počasnim zamrzovanjem, ko pri tvorbi ledenih kristalov v zunajceličnem okolju zunajcelična koncentracija topljenca naraste. Ker je membrana bolj prepustna za vodo, voda izteče iz celice hitreje kot se topljenec transportira v celice. Pri nadaljnjem ohlajanju volumski delež ledu naraste, kar privede do višje koncentracije topljenca v nezmrznjeni raztopini in hitrejšem prehajanju vode iz celice (Koster in Bryant, 2005; Steponkus, 1984; Garvey in sod., 2013).

2.3 METODA SHRANJEVANJA Z ZAMRZOVANJEM ALI KRIOPREZERVACIJA

Najbolj razširjena metoda dolgoročnega shranjevanja biološkega materiala, tudi matičnih celic, je krioprezervacija. Pri tem postopku se celice zamrzne v parah tekočega dušika pri zelo nizkih temperaturah pod -130 °C. Pri teh temperaturah se ohranijo tudi vse vitalne funkcije celic po odmrzovanju. Temelje zamrzovanja celic je postavil Ploge leta 1949, ko je s sodelavci objavil članek, kjer je opisal uspešno zamrzovanje in odmrzovanje sesalskih spermijev (Ploge in sod., 1949). Po tem dogodku se je tehnologija krioprezervacije začela močno razvijati (Dulugiac in sod., 2015; Marquez-Curtis in sod., 2015; Mitchell in sod., 2015; Pilbauerová in Suchánek, 2018; Ramos in sod., 2014; Yong in sod., 2015).

Poznamo počasno in hitro krioprezervacijo. Največkrat uporabljena metoda za krioprezervacijo matičnih celic je počasno zamrzovanje celic, kjer se celice ohlaja na -1 °C/min do temperature -80 °C (De Santis in sod., 2011; Asgar in sod., 2014). Pri počasnem zamrzovanju je tvorjenje znotrajceličnih kristalov upočasnjeno, saj ima voda dovolj časa, da difundira v zunajcelični prostor in pri tem ustvari novo osmotsko ravnotežje med topilom in topljencem. Po drugi strani pa so celice pri počasnem zamrzovanju dlje časa izpostavljene krioprotektantom, ki so običajno toksični za celico, kar privede do poškodbe celice

(Lovelock in sod., 1953). Poleg tega pri počasnem zamrzovanju kristali v zunajceličnem prostoru zrastejo večji in tako stisnejo celice med seboj, kar jih lahko poškoduje (Mazur, 1984; Hubel in sod., 1992). Nasprotno pri hitrem ohlajevanju temperatura pada zelo hitro in sicer od -60 do -120 °C/min (Samot in sod., 2011). Med zamrzovanjem se tvorijo kristali v zunajceličnem prostoru in tako odstranjujejo vodo iz raztopine krioprotektanta, s tem pa se povečuje njegova koncentracija. Da bi se ustvarilo novo ravnotežje v raztopini, voda v znotrajceličnem prostoru difundira v zunajcelični prostor. Pri zelo hitrem ohlajevanju voda nima dovolj časa, da difundira izven celice, zato pride do tvorjenja znotrajceličnih kristalov in poškodb v celici. Te poškodbe lahko zmanjšajo celično viabilnost, poškodujejo celično membrano, morfologijo ali citoskelet, kar se odraža v spremenjeni celični funkciji (Fowler in Toner, 2006; Lucena in sod., 2006; Leibo in Pool, 2011; Desrosiers in sod., 2006; Chen in Yang, 2009).

Proces krioprezervacije ohranja celice žive pri zelo nizkih temperaturah. Da pa celice lahko ohranijo svojo funkcijo in celično strukturo mora biti med postopkom krioprezervacije prisoten tudi krioprotektant, ki se ga doda celicam ali tkivu pred zamrzovanjem. Krioprotektant je snov, ki preprečuje nastanek kristalov v celici s tem, da zmanjša koncentracijo topila (vode) ter hkrati prepreči osmotski šok zaradi povečanja koncentracije topljenca (soli). Morebitni nastali kristali bi namreč med zamrzovanjem živo celico poškodovali in posledično bi prišlo do zmanjšanja celične viabilnosti (Karlsson in sod., 1996). Krioprotektant je torej substanca, ki ščiti celico pred poškodbami, ki nastanejo med postopkom zamrzovanja in odmrzovanja.

Poznamo več različnih krioprotektantov, mednje spadajo DMSO, glicerol, glikoli, glukoza, različni disaharidi, polioli in drugi (Brockbank in sod., 2010). Ločimo dve glavni skupini krioprotektantov: znotrajcelični in zunajcelični krioprotektanti. Znotrajcelični krioprotektanti, kot so DMSO, glicerol in propilen glikol, prehajajo celično membrano. Zunajcelični krioprotektanti, med katere sodijo večje molekule, kot so polimeri in sladkorji (npr. hidroksietil škrob (HES), polivinil pirolidon (PVP), polietilen glikol (PEG), trehaloza, dekstran,...), pa celične membrane ne prehajajo (Asghar in sod., 2014).

2.3.1 Značilnosti krioprotektanta DMSO

Dimetil sulfoksid (DMSO) je prvič sintetiziral ruski znanstvenik Alexander Zaytsev leta 1866. Sprva so ga uporabljali kot protivnetno zdravilo, a so kasneje ugotovili, da povzroča serijo stranskih učinkov (Vasovic in sod., 2018). Kot krioprotektant sta ga prvič uporabila Lovelock in Bishop pri krioprezervaciji humanih in govejih rdečih krvnih celic ter bikovih spermijev (Lovelock in Bishop, 1959). DMSO je najširše uporabljen krioprotektant v kriobiologiji, saj z njim lahko dosežemo več kot 90 % celične viabilnost po odmrzovanju. Standardna zamrzovalna raztopina vsebuje 10 % DMSO v serumu, ki je najpogostejše FBS.

DMSO je majhna amfifilna molekula s hidrofilno sulfoksidno skupino in dvema hidrofobnima metilnima skupinama. Zaradi svojih lastnosti zelo dobro prehaja skozi celično

membrano. Pri zamrzovanju deluje kot topilo, ki razrahlja celično membrano in pri tem ustvari pore, skoti katere uspešno preide v notranjost celice (Fry in sod., 2015; Gurtovenko in Anwar, 2007; Karlsson in sod., 1996). Slaba stran uporabe DMSO-ja je v tem, da je za celice zelo toksičen pri temperaturi nad 4 °C, zato ga je treba pri odmrzovanju čim hitreje odstraniti. Kljub temu se pri nekaterih celičnih terapijah, kot je na primer zdravljenje s popkovnično krvjo ali kostnim mozgom, uporablja zamrznjen celični produkt. To pomeni, da se celični pripravek takoj po odmrzovanju z intravensko infuzijo aplicira v pacienta, brez predhodnega odstranjevanja DMSO-ja. V primeru, da bi DMSO odstranjevali, bi lahko izgubili znatne količine celic (Syme in sod., 2004; Weng in sod., 2020). Čeprav je DMSO prisoten v nizkih koncentracijah, predstavlja takšna aplikacija za bolnika dodatno tveganje. Priporočljiva maksimalna meja za intravensko infuzijo DMSO-ja je 1 g/kg telesne teže (Júnior in sod., 2008). Pri infuziji DMSO-ja, predvsem pa pri večkratnih infuzijah lahko pride do več stranskih učinkov, kot je pordečitev kože, dispneja, krči v trebuhu, slabost, diareja, hipotenzija ali hipertenzija (Syme in sod., 2004; Júnior in sod., 2008). V nekaterih kliničnih terapijah povezujejo citotoksičnost DMSO-ja z nastankom srčnih aritmij (Zenhausern in sod., 2000), različnih nevroloških sprememb (Grigg in sod., 2000) in reverzibilne encefalopatije (Higman in sod., 2000). Kljub nekaterim stranskim učinkom velja DMSO za zlati standard med krioprotektanti, saj je cilj pridobiti čim več učinkovitih celic, ki ustavijo ali omejijo bolezensko stanje. Trendi uporabe DMSO-ja v krioprezervaciji pa težijo k uporabi v čim nižjih koncentracijah, da bi s tem zmanjšali njegove negativne stranske učinke. Obenem se iščejo alternativne možnosti krioprezervacije z uporabo drugih netoksičnih krioprotektantov, ki bi še vedno zagotavljali kvaliteto zamrznjenih celic (Weng in sod., 2020; Awan in sod., 2020; Morris in sod., 2014).

Za nadomestitev uporabe DMSO-ja pri krioprezervaciji terapevtskih celičnih pripravkov se uporabljata dve različni strategiji. Ena je iskanje enega ali kombinacije več primernih krioprotektantov, ki bi imeli podobne lastnosti kot DMSO pri zaviranju nastajanja kristalov in stabilizaciji membrane. Mednje spadajo sladkorji, alkoholi sladkorjev ali pa (gliko)proteini, ki posnemajo delovanje krioprotektanta. Sladkorji (trehaloza, saharoza, rafinoza,...) imajo navadno visoko afiniteto za prehajanje v steklasto obliko, kar se odraža v direktni vitrifikaciji nezamrznjene koncentrirane citoplazme med počasnim zamrzovanjem. Vitrifikacija je način zamrzovanja, ki zelo hitro ohladi tekočino in jo spremeni v steklo, ne da bi se pri tem tvorili kristali. Sladkorji lahko tudi stabilizirajo celično membrano preko vodikovih vezi. Alkoholi sladkorjev, kot je glicerol, lahko tvorijo vodikove vezi med molekulami vode in spremenijo obnašanje vode okoli celice pri samem zamrzovanju. Tako na primer spremenijo morfologijo kristalov in s tem zmanjšajo poškodbe na celici. Alkoholi sladkorjev lahko v notranjosti celice pomagajo preprečiti tvorjenje ledu tako, da z molekulami vode tvorijo vodikove vezi in preprečijo tvorjene kristalov. (Gliko)proteini, ki posnemajo delovanje krioprotektanta, pa delujejo tako, da zaustavijo rekristalizacijo, upočasnijo rast kristalov in znižajo temperaturo tališča. Mednje spadajo aril

glikozid, N-aril-d-aldonamid, poli(vinil alkohol) (PVA), poliamfolit in poliprolin (Weng in sod., 2020).

Drugi pristop v krioprezervaciji je razvoj novih tehnologij, ki bi zamenjale tradicionalno uporabo DMSO-ja. Te so celična enkapsulacija v hidrogelu (alginatno-hitinska mikrovlakna, supramolekularni gel, dvojnoemulzijski alginat), pri kateri se zniža koncentracija krioprotektanta pri vitrifikaciji (Narayanan in sod., 2012; Zeng in sod., 2016; Dluska in sod., 2019). Z nanoodtaljevanjem oz. nanosegrevanjem (angl. »nano-rewarming«, »nanowarming«, tudi »microwave warming«) lahko hitro in enakomerno odtalimo večje količine zamrznjenega vzorca. Pri tem pa se uporablja nanodelce železovega oksida (Fe_3O_4), ki lahko skupaj z radiofrekvenčnimi polji učinkovito in enakomerno segrevajo vzorec. S tem postopkom lahko povečamo volumne pri vitrifikaciji, saj je vitrifikacija omejena na majhne vzorce (Wang in sod., 2016). Kot zelo učinkovit krioprotektant se je pokazala tudi trehaloza, katero lahko med drugim vnesemo v celico s pomočjo nanodelcev, gensko-inženirskih produktov ali elektroporacije (Rao in sod., 2015, Buchanan in sod., 2004, Mutsenko in sod., Zhou in sod., 2010, Dovgan in sod., 2017).

2.3.2 Značilnosti krioprotektanta trehaloze

Nekateri sladkorji, ki jih najdemo v naravi, kot so trehaloza, saharoza ali rafinoza, imajo številne zaščitne lastnosti, ki delujejo kot netoksični krioprotektanti. Sami po sebi ne prehajajo ali težko prehajajo celično membrano, zato jih številni organizmi proizvajajo sami, da jih zaščitijo v ekstremnem okolju (Larson sod., 2014). Ko je celica v suhem okolju, sladkorji reagirajo z membranskimi proteini ter s tem stabilizirajo membrano. Najdemo jih lahko v številnih ekstremofilnih organizmih, kot so glive (Robinson, 2001), rastline (Tarkowski, 2015), nevretenčarji (Everatt, 2015), žabe, plazilci in ribe (Costanzo, 2013; Crowe in sod., 2000).

Trehaloza je disaharid, ki nastane s tvorbo 1,1-glikozidne vezi med dvema α -glukoznima enotama. Glikozidna vez nastane iz dveh reduciranih oblik glukoze, zato je trehaloza zelo stabilna v kislem okolju in pri visokih temperaturah. Glikozidna vez ohrani nereducirajoči sladkor v zaprti obliki obroča, tako da se ne more vezati preko ketonske ali aldehidne skupine na proteine, zato jo tudi α -glikozidaza ne more cepiti. (Higashiyama, 2002; Colaco in Roser, 1994). V naravi poleg $\alpha\alpha$ trehaloze obstajata tudi $\alpha\beta$ in $\beta\beta$ izomera, ki imata bistveno drugačne fizikalne lastnosti kot $\alpha\alpha$ trehaloza. (Elbein, 1974; Ohtake in Wang, 2011). Trehalozo največkrat najdemo v dihidratnem stanju, saj ima v tem stanju nizke higroskopne lastnosti, kar pomeni, da se voda težko veže nanjo, zato ostane stabilna tudi pri visoki izpostavljenosti vlagi. Med različnimi procesi sušenja, kot je na primer suho zamrzovanje (angl. freeze drying), se trehaloza hitro posuši v obliko amorfnega – nekristaliničnega materiala, ki ima visoko temperaturo steklastega prehoda nad $100\text{ }^\circ\text{C}$ (Ohtake in Wang 2011). To pomeni, da ima snov sposobnost, da med hitrim ohlajanjem tvori steklo – ohlajanje je dovolj hitro v primerjavi s hitrostjo kristalizacije, talina ne more kristalizirati, temveč obdrži neurejeno atomsko strukturo podhlajene taline, ki je prešla v trdno stanje pri

temperaturi steklastega prehoda, pri tem pa se kristali niso tvorili. (Phillips, 1979). Od drugih disaharidov se razlikuje tudi v visokem številu –OH skupin, kar se kaže v močnih interakcijah z vodo ter tvorbi vodnih skupkov (Tanaka, 2009; Ohtake in Wang, 2011). Vodni skupki pa so pomembni, ko je celica izpostavljena suhemu okolju. Zaradi svojih lastnosti je trehaloza zelo uporabna v različnih panogah, tako v farmaciji, prehrabni industriji ter kozmetiki in nenazadnje v krioprezervaciji. Ker trehaloza v kristaliničnem stanju težko veže vodo, je zelo uporabna v tabletah, kjer preprečuje lepljenje in s tem poveča njihovo stabilnost (Takeuchi in Banno, 1998; Ohtake in Wang, 2011). Uporablja se tudi pri stabilizaciji cepiv in liposomov ter prezervaciji organov (Crowe in sod., 2001). Učinkovita je v produktih za blaženje suhih oči in suhe kože (Matsuo, 2001). V kozmetičnih izdelkih zavira oksidacijo nekaterih maščobnih kislin, ki dajejo telesni vonj (Higashiyama, 2002). Zavira tudi poškodbe nastale zaradi tvorbe prostih radikalov (Benaroudj in sod., 2001) in nastanek zobnega kariesa (Neta in sod., 2000), pospešuje produkcijo etanola pri fermentaciji (Gimeno-Alcaniz in sod., 1999; Pataro in sod., 2002), stabilizira okus v hrani (Komes in sod., 2003) ter ščiti rastline pred fizičnim stresom (Garg in sod., 2002). V neki študiji so pokazali, da trehaloza celo zavira resorpcijo kosti pri miših, ki so jim odstranili jajčnike, najverjetneje s supresijo diferenciacije osteoklastov. To nakazuje, da bi lahko trehalozo uporabljali tudi za zdravljenje osteoporoze pri ljudeh (Nishizaki in sod., 2000; Yoshizane in sod., 2000). Druga študija je pokazala, da bi trehalozo lahko uporabili pri inhibiciji agregacije proteinov povezanih s Huntingtonovo boleznijo (Tanaka in sod., 2004; Couzin, 2004).

Mehanizem delovanja trehaloze med procesom krioprezervacije še ni natančno preučen, gre pa za enak mehanizem med procesom zamrzovanja ali sušenja, saj gre pri obeh procesih za izgubljanje vode. Obstajata dve različni hipotezi. Prva hipoteza o nadomestitvi vode govori o mehanizmu, kjer se trehaloza obnaša kot voda in tvori vodikove vezi z membranskimi proteini ter stabilizira celično membrano (Crowe in sod., 1998; Crowe in sod., 1989; Konov in sod., 2015). Druga hipoteza pa pravi, da trehaloza pri procesu izgubljanja vode oz. zamrzovanja tvori stabilno stekleno strukturo z izjemno nizko molekularno mobilnostjo. Tako trehaloza prekine kakršno koli presnovno aktivnost celice v dehidriranem stanju (Kanas in Acker, 2006; Rao in sod., 2015).

Za uspešno krioprezervacijo celic mora biti trehaloza prisotna tako na zunajcelični strani membrane kot tudi na znotrajcelični strani (Crowe in sod., 2005). Ker pa sesalčje celice niso sposobne same sintetizirati trehaloze in je celična membrana praktično nepropustna za takšne sladkorje, so raziskovalci poskušali dostaviti trehalozo znotraj celice na različne načine in v različnih koncentracijah (Stewart in He, 2019).

Beattie in sod. (1997) so izkoristili t.i. puščanje membrane med termotropnim prehodom lipidne faze (angl. thermotropic lipid-phase transition) pri celicah pankreasa - ICC (angl. islet like cell clusters) in odraslih pankreasnih otočkov. Pri termotropnem prehodu lipidne faze so med ohlajevanjem na 5 – 9 °C izpostavili celice [¹⁴C]-trehalozi, ki je na ta način

lahko prešla skozi celično membrano. Nato so celice zamrznili s 300 mM trehalozo in DMSO-jem. Po odmrzovanju je bila viabilnost celic zamrznjenih s trehalozo in DMSO-jem 92 % (odraslih otočkov) oz. 94 % (ICC) ter viabilnost celic zamrznjenih samo z DMSO-jem 58 % (odraslih otočkov) oz. 42 % (ICC).

Campbell in Brockbank (2012) sta endotelijske celice 24 h inkubirala v prisotnosti 200 mM koncentracije trehaloze, nato pa jih zamrznila v prisotnosti 0 – 600 mM trehaloze. Po odmrzovanju pri 400 in 600 mM trehalozi je bila metabolna aktivnost bistveno višja (okrog 30 %) kot pri nižjih koncentracijah trehaloze (okrog 0 %).

S hemolitično poracijo (tvorjene por z α -hemolizinom) so poskušali Eroglu in sod. (2000). Trehalozo so vnesli v celice tako, da so ustvarili prehodne pore v celični membrani s pomočjo toksina α -hemolizina. V celice so vnesli od 0 – 1 M trehalozo, 200 mM koncentracija trehaloze pa je bila dovolj učinkovita za uspešno krioprezervacijo mišjih fibroblastov (80 %) in humanih keratinocitov (70 %). Prav tako so Buchanan in sod. (2004) v humane hematopoetske celice uspešno vnesli 200 mM trehalozo s pomočjo toksina α -hemolizina.

Wolkers in sod. (2001) so liofilizirali humane trombocite. Po petih dneh so trombocite rehidrirali z 85 % preživetjem. Izmerili so, da je bil vnos trehaloze vsaj 50 %, najverjetneje s pinocitozo.

Mišje oocite so s trehalozo zamrzovali Eroglu in sod. (2009). Pred zamrzovanjem so z mikroiniciiranjem dovedli 0,15, 0,3 in 0,5 mM trehalozo v celico ter po odmrzovanju, pri 0,5 M trehalozi dobili preživetje več kot 80 %.

Guo in sod. (2000) so z gensko transfekcijo v humane fibroblaste vnesli zapis za sintezo trehaloze z rekombinantnimi adenovirusnimi vektorji. Inficirane celice so proizvedle visoke količine trehaloze. Nato pa so celice izpostavili suhemu stanju ter po treh dneh določili približno 40 % viabilnih celic.

Sharp in sod. (2013) so z amfifilnim polimerom PP-50 povečali propustnost membrane in s tem olajšali transport trehaloze v celice humane celične linije SAOS-2. Celična viabilnost po odmrzovanju je bila 60 %, po 24 urah pa se je metabolna aktivnost povišala na 103 %.

Abarazi in sod. (2015) so naredili inženirski lipofilni derivat trehaloze. Trehalozo so povezali s 6 acetilnimi skupinami, tako da je tvorila trehalozni heksaacetat. V celici jo je hidrolizirala esteraza ter sprostila prosto trehalozo v citoplazmo. Znotraj celice so zaznali tako visoko skupno koncentracijo trehaloze, kot je 10-kratna zunajcelična koncentracija trehaloznega heksaacetata.

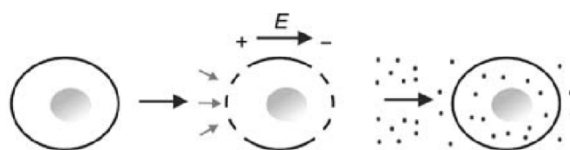
Rao in sod. (2015), so sintetizirali genipin-crosslinked Pluronic F127-hitozanske nanodelce, v katere so enkapsulirali trehalozo ter jo dostavili znotraj humanih celic ASC. Sprostitev trehaloze iz nanodelcev so olajšali tako, da so znižali pH z vnesenimi poznimi endosomi in

liposomi. S 24-urno preinkubacijo celic z nanodelci je bila viabilnost po odmrzovanju 88 % (pri 1,1 mM trehalozi) in 91 % (pri 6,2 mM trehalozi).

Vsi ti najrazličnejši načini vnosa trehaloze v celico niso privedli do dovolj uspešne krioprezervacije v primerjavi z zamrzovanjem z DMSO, ali pa so sami po sebi precej kompleksni postopki. Zato smo se v naši študiji poslužili drugačnega načina vnosa trehaloze - elektroporacije.

2.4 METODA PERMEABILIZACIJE MEMBRANE Z ELEKTROPORACIJO

Elektroporacija je metoda, s katero celici oziroma na celično membrano dovedemo električni tok, zaradi česar postane celična membrana začasno prepustna. Če gledamo iz električnega vidika, celična membrana deluje kot izolator obdan z obeh strani z vodno raztopino elektrolitov. Ko je izpostavljena dovolj visokemu električnemu polju in transmembranska napetost preseže vrednost 200 mV, električni dražljaj deluje na membrano, poveča se njena prepustnost in molekule lahko prehajajo skozi membrano (Slika 2) (Neumann in Rosenheck, 1972; Kotnik in sod., 2019; Kotnik in sod., 2012).

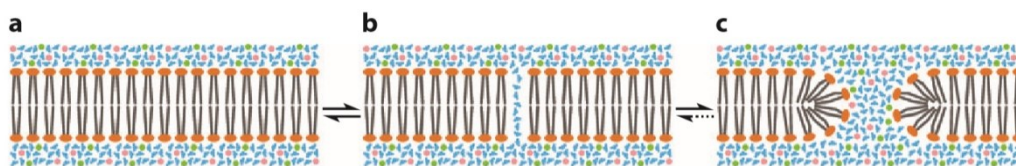


Slika 2: Shematski prikaz poteka elektroporacije. Po dovedenem električnem pulzu na celico se ustvari pore. Molekule, za katere membrana prej ni bila prehodna, jo sedaj lahko prehajajo. (Povzeto po Kandušer in Miklavčič, 2008).

Figure 2: Scheme of electroporation. After applied electric pulse, pore formation starts to create and nonpermeable molecule starts to enter the cell. (Adapted from Kandušer and Miklavčič, 2008).

Večina teoretičnih modelov, ki opisujejo elektroporacijo, temelji na teoriji, da se med elektroporacijo lipidni dvosloj uviha in tvori t.i. vodne pore (Kotnik in sod., 2019; Neumann in sod., 1989; Tsong, 1991; Chang in sod., 1992; Weaver in Chizmadzev, 1996). Pri vdoru vodnih molekul skozi lipidni dvosloj membrane se lipidi reorganizirajo in uvihajo membrano, tako da se s polarno glavo obračajo proti vodnim molekulam ter tako tvorijo poro (Slika 3). Nestabilne pore se lahko tvorijo tudi brez zunanjega električnega dražljaja, vendar je njihova življenjska doba le nekaj nanosekund. V primeru dovedenega električnega pulza pa se sprosti energija, potrebna za prehod vode skozi membrano. V prvih nekaj nanosekundah se prodiranje zgodi predvsem zaradi prenosa zunanjega polja na membrano, nato pa se transmembransko polje poveča, kar privede do nastanka vsiljene transmembranske napetosti. Vstop vode poveča možnost za nastanek por in posledično nastane večje število por v dvosloju, te pa so tudi bolj stabilne. Pri transmembranski napetosti nekaj sto milivoltov nastane dovolj veliko število por z dovolj dolgo povprečno

življenjsko dobo, da lahko zaznamo intenzivnejše prehajanje molekul, ki prej same po sebi niso bile sposobne prehajati membrane (Kotnik in Miklavčič, 2006; Schoenbach in sod., 2001; Yarmush in sod., 2014). Nastale vodne pore so velike nekaj nanometrov in so torej premajhne, da bi jih lahko opazovali z optičnim mikroskopom. Priprava preparatov za elektronsko mikroskopijo pa je prezahtevna, saj pore niso dovolj stabilne, da bi lahko prenesle dolgotrajno pripravo in da bi jih lahko ločili od artefaktov. S simulacijo molekularne dinamike pa v veliki meri lahko potrdimo hipotezo o nastanku takšnih por (Delemotte in Tarek, 2012; Yarmush in sod., 2014).



Slika 3: Shematski prikaz nastanka por. (a) Intaktni lipidni dvosloj. (b) Molekule vode začnejo prodirati skozi dvosloj in tvorijo t.i. vodne žice. (c) Lipidi se s polarno glavo začnejo obračati proti vodnim molekulam in tvorijo stabilno poro. (Povzeto po Yarmush in sod., 2014).

Figure 3: Scheme of pore formation. (a) The intact bilayer. (b) Water molecules start penetrating the bilayer, forming a water wire. (c) The lipids adjacent to the water wire start reorienting toward the wire with their polar head groups, stabilizing the pore and allowing more water, as well as other polar molecules and ions, to enter. (Adapted from Yarmush et al. 2014).

Elektroporacija je lahko reverzibilna ali ireverzibilna, odvisno od parametrov električnega pulza, ki je bil doveden celicam. Če je bil doveden pulz dovolj kratek, se lipidni dvosloj lahko povrne v predhodno stanje in celica ostane živa. Temu pravimo reverzibilna elektroporacija. Če pa je bil na membrano doveden premočan električni pulz in se celica ne more vrniti v predhodno stanje, temu pravimo ireverzibilna elektroporacija in celica umre (Yarmush in sod., 2014; Kotnik in sod., 2012). Kako uspešna bo elektroporacija je odvisno od parametrov dovedenega pulza: trajanja, amplitude ter frekvence (Kotnik in sod., 2019).

Uporaba elektroporacije v biotehnologiji in medicini sega na zelo različna področja. Ireverzibilno elektroporacijo se lahko uporablja za inaktivacijo mikroorganizmov in encimov pri konzerviranju hrane ter tudi pri inaktivaciji mikrobov v vodi. Hrana s takšno metodo ohrani barvo in okus ter nivo antioksidantov. Pri inaktivaciji mikrobov v vodi pa se s tem izognemo uporabi agresivnih kemikalij oziroma nastanku nevarnih stranskih produktov, ki lahko škodujejo našemu zdravju (klor, ozon) (Saulis, 2010; Haberl in sod., 2013). Ireverzibilna elektroporacija se uporablja tudi za ekstrakcijo biomolekul iz mikroorganizmov in rastlin (Sack in sod., 2010; Haberl in sod., 2013) ter v medicini za netermalno ablacijo tkiv (Geboers in sod., 2020) in srčno ablacijo (Sugrue in sod., 2019).

Pri reverzibilni elektroporaciji celica ostane viabilna. Z njeno uporabo celici dovedemo razne substance, ki same po sebi ne morejo prehajati celične membrane. Reverzibilna

elektroporacija je precej uporabna v kemoterapiji, saj z njo lahko uvedemo kemoterapevtik direktno v tumor ter tako povečamo učinkovitost kemoterapevtika in obenem zmanjšano njegove stranske učinke zaradi zmanjšane doze (elektrokemoterapija) (Serša in sod., 2008; Miklavčič in Davalos, 2015). Reverzibilna elektroporacija kaže uspehe tudi pri genskih terapijah, saj se izognemo uporabi virusnih vektorjev (genska elektrotransfekcija) (André in Mir, 2004; Kos in sod., 2019). In nenazadnje bi bila reverzibilna elektroporacija lahko uporabna tudi v krioprezervaciji humanih matičnih celic. Z elektroporacijo lahko enostavno vnesemo sladkorje, ki slabo ali ne prehajajo skozi membrano, kot je trehaloza, v različne tipe celic, kjer uspešno delujejo kot krioprotektanti. Elektroporacija je bila sprva uporabljena predvsem pri zamrzovanju rastlinskih celic oz. tkiva: špinače (Phoon in sod., 2008), krompirje (Shayanfan in sod., 2013) in rukole (Dymek in sod., 2014). Nato pa na eritrocitih (Zhou in sod., 2010) ter prvič tudi na humanih matičnih celicah (Dovgan in sod., 2017; Mutsenko in sod., 2019).

2.5 KRIPOREZERVACIJA TKIVA IZ POPKOVNICE

Razvoj medicine je v zadnjem obdobju izredno napredoval. Transplantacije organov in tkiv so postale uspešne, s tem pa se je dvignila tudi potreba po darovanih organih in tkivih. Kljub napredku medicine in biotehnologije zaenkrat še ne znamo vzgojiti novega tkiva ali organa v laboratoriju, zato so bolniki, ki potrebujejo transplantacijo, odvisni od darovalcev in hitrega transporta, saj mora biti transplantacija organov opravljena v nekaj urah od odvzema organa. Kratek čas hranjenja organov pa tako omejuje presaditve ter prispeva k pomanjkanju organov, poveča možnost zavrnitve presadka in omeji dolžino in kakovost življenja prejemnikov presadka. Če bi lahko podaljšali shranjevanje organov le na 5 – 7 dni, bi lahko pridobili veliko več možnosti za uspešnejše presaditve. Za kratkotrajno shranjevanje organov in tkiv je trenutno najboljša metoda podhladitev na nekaj stopinj nad lediščem. Dolgoročno shranjevanje zahteva bistveno nižje temperature, pri katerih pa se pojavi problem nekontrolirane rasti kristalov zaradi neenakomernega prenosa toplote in snovi skozi celotno maso organa ali tkiva in s tem povezane poškodbe tkiva. Poškodbe organov in tkiv nastanejo tudi zaradi ishemičnih poškodb, ki so posledica slabe prekrvavitve. Poleg tega se pri klasični krioprezervaciji celic uporablja krioprotektante, ki so toksični, zato je nujno, da bi se jih pri krioprezervaciji tkiv in organov uporabljalo v čim nižjih koncentracijah (Taylor in sod., 2019). Za uporabo pri transplantacijah pa lahko nekatera tkiva shranimo za obdobje več let, vendar takšna tkiva v telesu opravljajo le mehansko funkcijo in zato ni potrebe po ohranitvi živih celic (npr. kosti, tetive, koža) (Giwa in sod., 2017; Pegg 2006).

Kljub vsem omejitvam za ohranitev živega tkiva ali organa v hipotermičnem okolju, obstaja v naravi več vrst živali, tudi vretenčarjev in celo sesalcev, ki so se uspešno prilagodile nizkim temperaturnim razmeram. V hibernacijskem stanju se njihovo telo ohladi pod 0 °C ali celo do –30 °C, pri teh temperaturah pa so sposobne preživeti več dni, tednov in celo mesecev (Lowe in sod., 1971; Popovic P. in Popovic V., 1963; Richter in sod., 2015). Raziskovalci so za ohranjanje tkiv in organov ubrali različne strategije. Ena izmed njih je, da so privzeli

pristope iz narave in sicer podhladitev, kontrolirano delno zamrzovanje in enakomerna prezervacija pod 0 °C brez zamrzovanja (Taylor in sod., 2019).

Pri podhladitvi se tkivo ohladi na nekaj stopinj pod ničlo, pri tem pa se lahko uporabi visoke koncentracije nizkomolekularnih ogljikovih hidratov (sladkorjev), ki nadomestijo izgubljeno vodo, stabilizirajo fosfolipidni dvosloj in zmanjšajo nastanek znotrajceličnih kristalov. Lahko pa se uporabi tudi molekule, ki zaustavijo rast kristalov, tako da se povežejo z molekulsko površino, okoli katerih bi se drugače oblikovali kristali ledu. S tem pristopom so uspešno shranili podganja jetra na -6 °C za 3 – 4 dni (Berendsen in sod., 2014; Bruinsma in sod., 2015).

Kontrolirano delno zamrzovanje zajema postopno zamrzovanje, pri tem pa se izloča voda in tvori kristale na zunajcelični strani. Izgubljeno vodo pa je treba nadomestiti, najpogosteje z nizkomolekularnimi krioprotektanti (glukozni derivat 3-OMG) ali oligosaharidi (trehaloza) (Taylor in sod., 2019).

Princip delovanja pri enakomerni prezervaciji pod ničlo brez zamrzovanja (angl. »equilibrium nonfrozen subzero preservation«) ali tudi sledenje tekočini (angl. »liquidus tracking«), deluje na tem, da se med procesom ohlajevanja postopoma dviguje koncentracijo krioprotektanta, da se zmanjša njegova toksičnost in osmotski šok na celice ter se zagotovi ultrastabilno ravnotežje na določenih mestih, kjer se kristali ledu ne morejo tvoriti (Kay in sod., 2015; Puschmann in sod., 2014).

Druga strategija shranjevanja tkiv in organov pa se je razvila z bioinženerskimi tehnikami, kot so nanotehnologija ali izohorno tlačno shranjevanje. Te tehnike zajemajo pristope pri katerih ne pride do tvorbe kristalov in temeljijo na principu vitrifikacije (Taylor in sod., 2019). Največkrat se jo uporablja za krioprezervacijo spermijev in jajčec, saj se zaradi majhnih in dragocenih vzorcev tako izognemo tvorjenju kristalov, ki bi uničili celice (Fahy in Wowk, 2015).

Do sedaj je bila vitrifikacija uspešna le pri majhnih volumnih, saj se tam lažje zagotovi enako razporeditev temperature in prepreči tvorjenje kristalov. Prav tako je zelo pomembno hitro odtaljevanje vzorcev, da ne bi prišlo do revitrifikacije – kristalizacije med odtaljevanjem. Z razvojem nanosegrevanja pa lahko odtaljujemo tudi večje vzorce, saj lahko zagotovimo hitro in enakomerno segrevanje vzorca, ker segrevamo od znotraj in ne samo iz zunanje površine (Bischof in Diller, 2018). Tako so Manuchehrabadi in sod. (2017) uspešno segreli do 80 mL vitrificiranega vzorca s hitrostjo 100 °C/min.

Izohorna krioprezervacija deluje po principu višanja tlaka med zamrzovanjem pri konstantnem volumnu. S tem se izognemo tvorbi kristalov in lahko uporabimo nižje koncentracije krioprotektantov (Rubinsky, 2005). Uspešno so jo uporabili pri krioprezervaciji mišice ribe, prehrabnih produktov in celega organizma *C. elegans*. (Lyu in sod., 2017; Năstase in sod., 2017; Mikus in sod., 2016).

Transplantacijska medicina pa ni edina veja, ki bi lahko s pridom uporabila uspešno krioprezervacijo tkiv in organov. Z razvojem biobančništva se je zanimanje za shranjevanje tkiva z namenom pridobiti matične celice za kasnejšo uporabo povečalo. Shranjevanje tkiva s krioprezervacijo in ne le izoliranih celic ima več prednosti: potrebujemo manj časa in dela, manj je materialnih stroškov, celice shranimo v njihovem naravnem okolju, možna postane izolacija in uporaba celic, ki jih sedaj morda še ne poznamo ter izolacija in namnožitev celic v skladu s standardi, ki bi veljali v prihodnosti (Arutyunyan in sod., 2018).

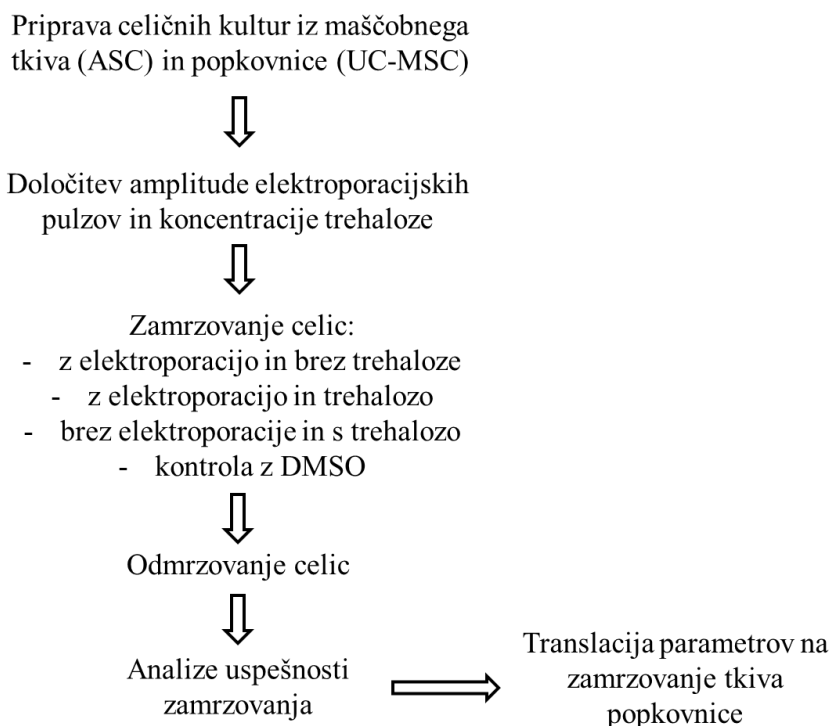
Kot odličen vir celic MMC se je izkazalo že več tkiv, med njimi tudi maščobno tkivo, zobna pulpa ter popkavnica. Ker pa je njihov vir pridobivanja (časovno) omejen, jih je smiselno shraniti čim prej, predvsem popkavnico, ki je omejena le na enkratni življenjski dogodek - rojstvo. Pridobivanje celic iz popkavnice moramo opraviti, ko je tkivo še sveže, nekje v roku do 72 ur od odvzema, oziroma poroda. Sama izolacija celic je precej dolgotrajna; da pridobimo dovolj veliko število celic za nadaljnjo uporabo - traja lahko med 7 in 14 dni oziroma celo več. Zato se vse bolj razvija tehnologija za zamrzovanju celotnega tkiva, iz katerega bi lahko kasneje pridobili celice za uporabo.

Že veliko raziskovalnih skupin je bolj ali manj uspešno zamrznilo in odmrznilo maščobno tkivo (Pu, 2009), zobno pulpo (Woods in sod., 2009) ter tkivo popkavnice (Arutyunyan in sod., 2018), kjer so kot krioprotektant uporabili DMSO ali DMSO v kombinaciji z drugimi substancami. Tudi pri krioprezervaciji popkavnice je večina raziskovalnih skupin uporabila 10 % DMSO, pri čemer so rast celic po odmrzovanju zaznali med 7 – 14 dni po odmrzovanju. Uspešno je bilo tudi testiranje na MMC fenotip ter diferenciacijski potencial. (Shivakumar in sod., 2016; Roy in sod., 2014; Shimazu in sod., 2015; Badowski in sod., 2014; Romanov in sod., 2016; Dulugiac in sod., 2015; Fong in sod., 2016; Yang in sod., 2016; Skiles in sod., 2018).

Kot že večkrat omenjeno, je toksičnost DMSO-ja lahko omejitveni faktor tudi pri pridobivanju viabilnih celic po odmrzovanju tkiva. Zato smo v našem raziskovalnem delu želeli DMSO nadomestiti s kombinacijo trehaloze ter elektroporacije tudi pri zamrzovanju tkiva popkavnice.

3 MATERIAL IN METODE

POTEK DELA



Slika 4: Shema poteka poskusov.

Figure 4: Scheme workflow of the experiments.

3.1 PRIPRAVA CELIČNIH KULTUR

Poskuse smo izvajali na humanih mezenhimskih matičnih celicah (MMC), izoliranih iz lipoaspirata (ASC) in tkiva popkovnice (UC-MSC). Poskuse na tkivih smo opravili na tkivu popkovnice. Vsi vzorci so bili prostovoljno darovani na podlagi pridobljenega dovoljenja Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko za namene raziskav podjetju Educell d. o. o. (št. 21/09/07) in Biobanka d. o. o. (št. 136/02/12).

Tkivo popkovnice smo pridobili ob porodu in najkasneje v 48 urah od odvzema tkivo obdelali. Celično kulturo UC-MSC smo pridobili s pripravo eksplantov, tako da smo tkivo popkovnice vzdolžno prerezali, odstranili žile in tkivo narezali na koščke velikosti 1 – 15 mm³ (Pirjali in sod., 2013). Koščke tkiva smo nasadili v posodo s hranilnim medijem in jih gojili v hranilnem mediju DMEM/F-12 (Gibco) s 10 % fetalnim govejim serumom (FBS), 50 µg/mL gentamicina (Gibco) in 1 ng/mL bFGF (PeproTech) pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂. Hranilni medij smo zamenjali na 2-4 dni. Ko so celice pričele izraščati iz tkiva in dosegle 80 – 95 % preraščenost v posodi, smo jih odlepili od podlage z 0,05 % tripsin-EDTA

(Sigma Aldrich) in presadili v novo gojilno posodo. Za poskuse smo uporabili celice od tretje (P3) do šeste (P6) pasaže.

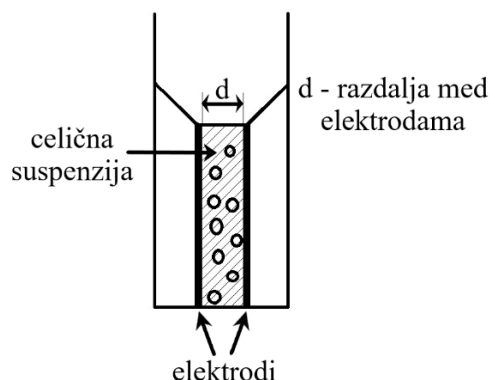
Maščobno tkivo smo pridobili pri liposukciji in najkasneje v 48 urah od odvzema tkivo obdelali. Celično kulturo ASC smo pridobili kot je opisano v Zuk in sod. (2001). Iz maščobnega tkiva smo najprej s spiranjem odstranili maščobo, nato pa s kolagenazo tkivo razgradili in pridobili stromalno vaskularno frakcijo, ki smo jo nasadili v gojilno posodo s hranilnim medijem in gojili celice v hranilnem mediju DMEM/F-12 (Gibco) z 10 % fetalnim govejim serumom (FBS), 50 µg/mL gentamicina (Gibco) in 1 ng/mL bFGF (PeproTech) pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂. Hranilni medij smo zamenjali na 2 – 4 dni. Ko so celice dosegle 80 – 95 % preraščenost v posodi, smo jih odlepili od podlage z 0,05 % tripsin-EDTA in presadili v novo gojilno posodo. Za poskuse smo uporabili celice od tretje (P3) do šeste (P6) pasaže.

3.2 PERMEABILIZACIJA CELIČNE MEMBRANE Z ELEKTROPORACIJO

Permeabilizacijo celične membrane smo ugotavljali pri različnih napetostih; 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 in 680 V (kar ustreza 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 in 3,4 kV/cm jakosti električnega polja). Uspešnost permeabilizacije smo preverjali z meritvijo vsebnosti propidijevega jodida (PI) v celici ter vzporedno preverjali viabilnost permeabiliziranih celic z obarvanjem z MTT. Poskus je bil narejen v štirih neodvisnih ponovitvah.

3.2.1 Elektroporacija

100 µL celične suspenzije z gostoto 1×10^6 celic smo pripravili v nizko prevodnem elektroporacijskem pufru (10 mM K₂HPO₄ (Merck), 10 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ ter 250 mM trehaloze, vsi Sigma Aldrich), ki je za testiranje permeabilizacije vseboval 0,15 mM PI (Gibco). Celice smo prenesli v elektroporacijske kivete širine 2 mm (Peqlab) (Slika 5) in jih elektroporirali z elektroporatorjem (Jouan GHT 1287 B) pri pogojih 8 pulzov dolžine 100 µs in ponavljalni frekvenci 1 Hz ter pri napetostih 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 in 680 V. Pulzi so bili izmerjeni z osciloskopom (Tektronix TDS 3012). Po 2 min smo celice prenesli v mikrocentrifugirke. Jakost električnega polja (E) smo preračunali tako, da smo napetost (U) delili z razdaljo med elektrodama v kivetu (d).



Slika 5: Shematski prikaz kivete za elektroporacijo. Celice so zbrane v celični suspenziji v kiveti. Električni pulz na celice v suspenziji dovedemo preko elektrod, ki so v stiku s celično suspenzijo.

Figure 5: Schematic presentation of electroporation cuvette. Electric pulse is applied to the cells in the suspension, via electrodes which are in contact with the cell suspension.

3.2.2 Permeabilizacija membrane

PI je rdeče fluorescentno barvilo, ki označuje mrtve celice. Pri živih celicah je celična membrana intaktna in je PI ne more prehajati. Pri mrtvih celicah pa PI vstopi v celico, kjer se veže na DNA in oddaja rdečo fluorescenco pri 530/615 nm. Ker se pri elektroporaciji poruši celična integriteta lahko PI zaradi povečane prepustnosti membrane vstopi v živo celico in se veže na DNA. PI (0,15 mM) smo dodali elektroporacijskem pufru in celice v njem elektroporirali. Po 2 minutni inkubaciji smo PI, ki ni prešel v celice, odstranili s centrifugiranjem 5 min pri $300 \times g$ ter supernatant odstranili. Pelet celic smo resuspendirali v DMEM/F-12 ter celice nasadili v ploščice z 96 vdolbinicami z gostoto 260.000 celic na vdolbinico. Izmerili smo fluorescenco PI pri 530/615 nm s čitalcem mikrotiterskih plošč (Chameleon, Hidex). Odstotek permeabilizacije (%) smo izračunali tako, da smo izmerjene vrednosti fluorescence pri različnih jakosti električnega polja delili z najintenzivnejšo fluorescenco najbolj poriranih celic.

3.2.3 Celična viabilnost – test MTT

Celično viabilnost smo preverjali s kolorimetričnim testom MTT, ki temelji na aktivnosti mitohondrijskega encima sukcinat dehidrogenaze, ki tetrazolijevo sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolni bromid reducira v formazan, netopen produkt vijolične barve. Po raztapljanju v kislem izopropanolu produkt spektrofotometrično kvantificiramo in določimo delež živih, metabolno aktivnih celic (Mosmann, 1983).

Test MTT smo izvedli kot je opisal Mosmann (Mosmann, 1983) z manjšimi spremembami. Po elektroporaciji smo celice nasadili v hranilnem mediju na ploščico z 96 vdolbinicami z gostoto 50.000 celic na vdolbinico in inkubirali čez noč na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $5\% \text{ CO}_2$. Naslednji dan smo odstranili medij in ga nadomestili s $100\text{ }\mu\text{L}$ 10% raztopine MTT (končne koncentracije

0,5 mg/mL v DMEM/F-12, Sigma Aldrich). Po vsaj 6-ih urah inkubacije na 37 °C so se razvili vijolično obarvani kristali formazana. Raztopina MTT-ja smo odstranili in kristale raztopili v 100 µL kislega izopropanola (0,04 HCl, v 99 % izopropanolu, Sigma Aldrich). Nato smo izmerili absorbanco pri 570 nm in ozadje pri 660 nm (ki smo ga odšteli od izmerjene vrednosti pri 570 nm) s čitalcem mikrotiterskih plošč (Chameleon, Hidex). Odstotek viabilnih celic (%) smo izračunali tako, da smo izmerjene vrednosti absorbance pri različnih jakosti električnega polja delili z absorbanco neporiranih celic.

3.3 CELIČNA VIABILNOST PRED IN PO KRIOPREZERVACIJI CELIC

Celično viabilnost smo preverjali z dvema različnima metodama in sicer s štetjem s tripan modrim in testom MTT. V prvem delu poskusov smo preverjali celično viabilnost celic ASC pred in po krioprezervaciji pri neelektroporiranih in elektroporiranih celicah v prisotnosti 250 in 400 mM trehaloze. Nato smo preverjali celično viabilnost tako ASC kot UC-MSK pred in po krioprezervaciji pri neelektroporiranih celicah v prisotnosti različnih koncentracij trehaloze (0, 10, 50, 100 in 250 mM TH + 0 kV/cm) in elektroporiranih celicah pri 1,5 kV/cm v prisotnosti različnih koncentracij trehaloze (0, 10, 50, 100 in 250 mM TH + 1,5 kV/cm). Kot kontrolo pred krioprezervacijo smo vedno izbrali netretirane celice. Po krioprezervaciji pa so bile kontrola netretirane celice zamrznjene s standardnim protokolom z 10 % DMSO. Poskus je bil narejen na vsaj štirih neodvisnih ponovitvah.

3.3.1 Elektroporacija celičnih suspenzij

100 µL celične suspenzije z gostoto 1×10^6 celic smo pripravili v nizko prevodnem elektroporacijskem puftru (10 mM K_2HPO_4 (Merck), 10 mM KH_2PO_4 , 1 mM $MgCl_2$, vsi Sigma Aldrich) v prisotnosti različnih koncentracij trehaloze; 0, 10, 50, 100 in 250 mM. Pufrom s koncentracijo trehaloze od 0 – 100 mM smo zagotovili fiziološko osmolalnost ~300 mOsm/kg tako, da smo raztopinam dodali različne koncentracije NaCl (Sigma Aldrich). 250 mM in 400 mM trehalozi NaCl nismo dodajali. Izmerjena osmolalnost 250 mM trehaloze je bila ~290 mOsm/kg in 400 mM trehaloze ~410 mOsm/kg (hiperosmotsko okolje). Osmolalnost pufrov smo izmerili z metodo znižanja tališča s krioskopom Knauer (Knauer 7312400000). 100 µL celične suspenzije smo prenesli v elektroporacijske kivete širine 2 mm in vzorce elektroporirali z elektroporatorjem (Jouan GHT 1287 B pri poskusih na ASC z 250 in 400 mM trehalozo in elektroporator BTX Gemini pri vseh ostalih poskusih) v razmerah: 8 pulzov, dolžine 100 µs in frekvenci 1 Hz pri napetosti 300 V (kar ustreza 1,5 kV/cm jakosti električnega polja). Pulzi so bili izmerjeni z osciloskopom (Tektronix TDS 3012) pri poskusih na ASC z 250 in 400 mM trehalozo. Neelektroporirane celice (označene kot 0 kV/cm) so bile obravnavane enako kot elektroporirane, le da niso bile predstavljene v kiveto. Po 2 min smo 95 µL celic prenesli v zamrzovalno posodico. Celice smo še dodatnih 30 min inkubirali pri 37 °C, da se je celična membrana zacelila.

3.3.2 Krioprezervacija celic

Krioprezervacija je potekala z različnima krioprotektantoma: DMSO ali trehalozo. Standardni protokol zamrzovanja predstavlja 10 % DMSO v 90 % FBS (v nadaljevanju DMSO). Pri zamrzovanju s trehalozo smo uporabili elektroporacijski pufer z različnimi koncentracijami (0, 10, 50, 100, 250 in 400 mM) trehaloze (v nadaljevanju TH + 0 kV/cm ali TH + 1,5 kV/cm) ter celice zamrznili neposredno po elektroporaciji in/ali po 30 minutni inkubaciji. Za zamrzovanje celic z DMSO-jem smo v mikrocentrifugirko prenesli želeno število netretiranih celic, jih centrifugirali 5 min na $500 \times g$ ter odstranili supernatant. Celicam smo počasi po kapljicah dodali krioprotektant ter obenem nežno mešali. Nato smo celično suspenzijo prenesli v zamrzovalne posodice ter celice takoj zamrznili v posodi za kontrolirano zamrzovanje (Mr. Frosty, Thermo Fisher Scientific) do temperature $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ s hitrostjo ohlajevanja $-1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Naslednji dan smo celice prestavili v pare tekočega dušika na $-180 \text{ }^\circ\text{C}$ za vsaj en teden. Po enem tednu smo celice odmrznili. Celice zamrznjene v trehalozi smo odmrznili s 100 mM trehalozo v DMEM/F-12 (predhodno segrete na $37 \text{ }^\circ\text{C}$) (pri poskusu krioprezervacije ASC z 250 in 400 mM trehalozo, smo odmrzovali z 250 mM trehalozo), celice zamrznjene z DMSO pa z 20 % FBS v DMEM/F-12 (predhodno segretega na $37 \text{ }^\circ\text{C}$). Medij za odmrzovanje smo dodajali med samim odmrzovanjem v zamrzovalno posodico. Krioprotektant smo razredčili 7-10-krat ter ga odstranili takoj po centrifugiranju celic 5 min na $500 \times g$.

3.3.3 Celična viabilnost

Celično viabilnost smo izmerili pred in po krioprezervaciji z metodama barvanja s tripan modrim in testom MTT. Pred zamrzovanjem smo celice vzorčili za testiranje viabilnosti tik pred zamrzovanjem, po odmrzovanju pa po odstranitvi krioprotektanta.

3.3.3.1 Barvanje s tripan modrim

Barvilo tripan modro omogoča določanje celične viabilnosti in temelji na principu, da imajo žive celice intaktno membrano, ki zavrača barvilo, medtem ko pa v mrtve celice barvilo skozi poškodovano celično membrano vstopa v znotrajcelični prostor. Celice pod mikroskopom lahko ločimo na žive – neobarvane in mrtve – modre celice.

Celice smo v razmerju 1 : 1 razredčili v 0,4 % tripan modrilu (Fluka) ter prešteli mrtve in žive celice pod invertnim mikroskopom (Nikon, Eclipse TS100). Odstotek viabilnosti smo izračunali na podlagi živih (neobarvanih) celic glede na celokupno število celic, ki smo jih prešteli na hemocitometru.

3.3.3.2 Test MTT

MTT test smo naredili kot je opisano v poglavju 3.2 Permeabilizacija celične membrane z elektroporacijo oz. 3.2.3 Celična viabilnost – test MTT.

3.4 DOLOČANJE ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE TREHALOZE

Določanje znotrajcelične koncentracije trehaloze je potekalo pri različnih temperaturah inkubacije (4, 25 in 37 °C ali brez inkubacije) tako pred, kot po krioprezervaciji, pri neelektroporiranih celicah v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 0 kV/cm) in elektroporiranih celicah v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 1,5 kV/cm). Kot kontrolo pred zamrzovanjem smo uporabili netretirane celice, kjer znotrajcelične trehaloze ne bi smeli zaznati. Po odmrzovanju pa je bil kontrolni vzorec netretiranih celic zamrznjen z DMSO. Poskus je bil izveden enkrat, v treh tehničnih ponovitvah.

3.4.1 Elektroporacija:

Elektroporacija je bila izvedena kot je opisano v poglavju 3.3 Celična viabilnost pred in po krioprezervaciji oz. 3.3.1 Elektroporacija celičnih suspenzij, le da smo uporabili le 250 mM trehalozo in po elektroporaciji inkubirali celice pri različnih temperaturah (4, 25 in 37 °C) ali pa celic nismo inkubirali.

Po elektroporaciji oz. inkubaciji smo eno polovico celic uporabili za določanje znotrajcelične trehaloze pred zamrzovanjem, drugo polovico pa smo zamrznili.

3.4.2 Krioprezervacija:

Krioprezervacija je bila izvedena, kot je opisano v poglavju 3.3 Celična viabilnost pred in po krioprezervaciji oz. 3.3.2 Krioprezervacija celic.

3.4.3 Določanje koncentracije znotrajcelične trehaloze

Za določanje koncentracije znotrajcelične trehaloze smo vse vzorce zbrali v mikrocentrifugirkah po 500.000 – 800.000 celic. Celice smo 3-krat spirali v PBS (Gibco), da smo odstranili zunajcelično trehalozo, ki ni prehajala v celice. Po zadnjem spiranju smo celice resuspendirali v 135 mM pufru citronske kisline (Sigma Aldrich) pH = 5,7 in celice inkubirali 15 min na 95 °C, da se je sprostila vsa znotrajcelična trehaloza v medij. Nato smo trehalozo encimsko razgradili z encimom trehalaza (končne koncentracije 0,2 U/mL, Sigma Aldrich) z 18 – 20 urno inkubacijo. Po razgradnji trehaloze na glukozo smo izmerili koncentracijo glukoze z glukoznim testom (Glucose (GO) Assay kit, GAGO-20, Sigma Aldrich) po navodilih proizvajalca. Absorbance smo izmerili pri 540 nm ter ozadje pri 660 nm, ki smo ga nato odšteli od meritev pri 540 nm s čitalcem mikrotiterskih plošč (Chameleon, Hidex). Za izračun koncentracije znotrajcelične trehaloze smo najprej pripravili umeritveno krivuljo standardnih koncentracij glukoze (mM) v odvisnosti od izmerjene absorbance. Nato smo iz umeritvene krivulje pridobili vrednosti koncentracije glukoze izmerjenih vzorcev. Za preračun koncentracije trehaloze, smo pri računanju upoštevali redčitvene faktorje, nato pa smo vrednosti delili z 2, saj se je 1 trehaloza razgradila na 2 glukozi, ter znotrajcelično koncentracijo preračunali na celoten volumen celic. Volumen ene celice smo izračunali po enačbi za volumen krogle, kjer smo za polmer upoštevali povprečno velikost celic ASC (17 µm) in UC-MSK (15 µm). Povprečno velikost celic smo

izmerili z avtomatskim celičnim števcem (Countess, Invitrogen). Volumen vseh celic smo dobili tako, da smo volumen ene celice pomnožili s številom vseh celic. Koncentracijo znotrajcelične trehaloze smo tako preračunali po enačbi, kjer smo koncentracijo trehaloze izmerjene v raztopini množili z volumnom raztopine ter delili z volumnom vseh celic, pri katerem smo upoštevali 50 % prostega volumna v celici (Oliver in sod., 2004; Wolkers in sod., 2001). Predstavljeni rezultati so približki koncentracij znotrajcelične trehaloze, saj že zelo majhne spremembe v velikosti celic ter števila celic bistveno spremenijo celotni volumen celic in posledično tudi koncentracijo znotrajcelične trehaloze. Naše meritve velikosti celic (15 μm) so bile primerljive z meritvami drugih študij (Oliver in sod., 2004). Da smo preverili ali se je celotna trehaloza razgradila na glukozo, smo encimu izpostavili tudi 100 in 250 mM trehalozo v citratnem pufru po enakem protokolu kot vzorce celic. Znotrajcelično trehalozo smo preverili tudi netretiranim celicam pred zamrzovanjem ter zamrznjenim z DMSO po zamrzovanju, ki trehalozi niso bile izpostavljene.

3.5 CELIČNA MORFOLOGIJA IN DIFERENCIACIJA

Celično morfologijo in diferenciacijo smo preverjali pred in po krioprezervaciji pri elektroporiranih celicah v prisotnosti 250 mM trehaloze in neelektroporiranih celicah v prisotnosti 250 mM trehaloze, pri celicah ASC pa tudi v prisotnosti 400 mM trehaloze. Testirane vzorce smo preverjali s kontrolnimi celicami, ki so bile pred zamrzovanjem netretirane, nato pa zamrznjene z DMSO.

Celično morfologijo smo opazovali pri celicah nasajenih v hranilnem mediju po 24-urah po tretiranju oz. odmrzovanju celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom (Nikon, Eclipse TS100). Celično funkcionalnost pa smo preverjali s testoma celične adipogene in osteogene diferenciacije.

Elektroporacija je bila izvedena kot je opisano v poglavju 3.3 Celična viabilnost pred in po krioprezervaciji oz. 3.3.1 Elektroporacija celičnih suspenzij, le da smo pri celicah ASC uporabili 250 in 400 mM trehalozo, pri celicah UC-MSK pa le 250 mM trehalozo. Krioprezervacija je bila izvedena, kot je opisano v poglavju 3.3 Celična viabilnost pred in po krioprezervaciji oz. 3.3.2 Krioprezervacija celic.

3.5.1 Adipogena diferenciacija

Za adipogeno diferenciacijo smo celice nasadili v ploščo z 12 vdolbinicami. Ko so celice dosegle 70 – 80 % preraščenost, smo eni polovici vzorcev dodali medij za adipogeno diferenciacijo, druga polovica pa je bila kontrola v običajnem hranilnem mediju.

Celice ASC smo inducirali z medijem, ki je vseboval: DMEM/F-12, 5 % FBS, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicina, 10 $\mu\text{g/mL}$ inzulina, 1 μM deksametazona, 200 μM indometacina in 500 μM 3-izobutil-1-metilksantina (vsi Sigma Aldrich). Kontrolne celice smo gojili v 5 % hranilnem mediju. Celice smo gojili 2 tedna pri 37 °C in 5 % CO_2 . Medij smo zamenjali na 3-4 dni.

Celice UC-MSC smo inducirali v komercialnem mediju StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco), po navodilih proizvajalca. Kontrolne celice smo gojili v 5 % hranilnem mediju. Celice smo gojili 2 tedna pri 37 °C in 5 % CO₂, medij smo zamenjali na 3-4 dni.

Po 2 tednih smo kvalitativno dokazovali prisotnost maščobnih kapljic, ki jih tvorijo celice v svoji citoplazmi med adipogeno diferenciacijo ter jih pobarvali z barvilom Oil Red O (Sigma Aldrich). Celice smo opazovali in slikali pod invertnim svetlobnim mikroskopom.

3.5.2 Osteogena diferenciacija

Za osteogeno diferenciacijo smo celice nasadili v ploščo z 12 vdolbinicami. Ko so celice dosegle 70 – 80 % preraščenost, smo eni polovici vzorcev dodali medij za osteogeno diferenciacijo, druga polovica pa je bila kontrola v običajnem hranilnem mediju.

Celice ASC smo inducirali z medijem, ki je vseboval: DMEM/F-12, 5 % FBS, 50 µg/mL gentamicina, 200 mM GlutaMAX (Gibco), 0,1 mM askorbinsko kislino, 0,1 µM deksametazon in 10 mM β-glicerofosfat (vsi Sigma Aldrich). Kontrolne celice smo gojili v 5 % hranilnem mediju. Celice smo gojili 4 tedne pri 37 °C in 5 % CO₂. Polovični volumen medija smo zamenjali na 3-4 dni.

Celice UC-MSC smo inducirali v komercialnem mediju StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco) po navodilih proizvajalca. Kontrolne celice smo gojili v 5 % hranilnem mediju. Celice smo gojili 4 tedne pri 37 °C in 5 % CO₂. Polovični volumen medija smo zamenjali na 3-4 dni.

Po 4 tednih so se tvorili depoziti kalcija, ki smo jih preverjali z metodo določevanja celokupnega kalcija s testom Calcium LiquiColor test (StanBio Laboratory) po navodilih proizvajalca.

3.6 ANALIZA IZRAŽANJA STRESNIH GENOV

Analiza izražanja stresnih genov je potekala v različnih časovnih točkah (0, 3, 6 in 12 h) pred in po krioprezervaciji pri neelektroporiranih celicah v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 0 kV/cm) in elektroporiranih celicah v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 1.5 kV/cm). Pred zamrzovanjem so bile naše kontrolne celice netretirane (brez elektroporacije in brez trehaloze), po odmrzovanju pa so bile kontrolne celice zamrznjene z DMSO.

Elektroporacija je bila izvedena kot je opisano v poglavju 3.3 Celična viabilnost pred in po krioprezervaciji oz. 3.3.1 Elektroporacija celičnih suspenzij, le da smo uporabili 250 mM trehalozo. Krioprezervacija je bila izvedena kot je opisano v poglavju 3.3 Celična viabilnost pred in po krioprezervaciji oz. 3.3.2 Krioprezervacija celic.

Po elektroporaciji smo celice pripravili za analizo genske ekspresije: polovico smo jih pripravili za analizo pred zamrzovanjem, drugo polovico pa za analizo po odmrzovanju. Celice za analizo smo pripravili v različnih časovnih intervalih pri 0 ur (celice smo vzorčili takoj) ali jih nasadili za 3, 6 oziroma 12 ur v hranilni medij. Enako smo postopali pri svežih in odmrznjenih celicah ter pri kontrolnih vzorcih. Vzorčenje in RNA izolacijo smo izvedli s testom GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich) skladno z navodili proizvajalca, le da nismo uporabili β -merkaptetoanola. Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili s testom Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit (Invitrogen). Količino smo določili spektrofotometrično z merjenjem fluorescence 490/520 nm. Iz 500 ng izolirane RNA smo pripravili cDNAs pomočjo testa High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) ter vzorce shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do uporabe. Kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR) smo naredili v ploščicah s 384 vdolbinicami (10 μl reakcije) z uporabo TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) in TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) ter vzorce analizirali na 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Analizirali smo izražanje naslednjih genov: B-celični limfom 2 – *bcl2* (Hs00608023_m1), heat shock protein velikosti 70 kilodaltonov – *hsp701a* (Hs00359163_s1), heat shock protein 27 – *hsp27* (Hs00155436_m1), tumorski protein p53 – *tp53* (Hs01034249_m1), superoksid dismutaza 2 – *sod2* (Hs00167309_m1) in beta-2-mikroglobulin – *b2m* (Hs00187842_m1). Za normalizacijo izražanja genov smo uporabili referenčni gen, *b2m*, saj je bilo izražanje tega gena med pogoji poskusa konstantno. Analizo podatkov smo izvedli z ABI 7900HT Sequence Detection System, verzija 2.4. Reakcije so bile izvedene v dveh tehničnih ponovitvah. Za relativno kvantifikacijo podatkov smo uporabili enačbo $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2) pri čemer smo od vrednosti Cq tarčnega gena odšteli vrednost Cq endogene kontrole, da smo pridobili vrednost ΔCq . Za pridobitev $\Delta\Delta Cq$ smo vzorce kalibrirali na meritve netretiranih vzorcev pred zamrzovanjem pri $t = 0$ h. Rezultate smo predstavili kot Log_2 relativne količine (Log_2 RQ).

3.7 IZRAŽANJE GENOV Z AKTIVACIJO VNETHNIH FAKTORJEV

Odzivnost MMC na aktivacijo z vnetnima faktorjema $\text{IFN}\gamma$ in $\text{TNF}\alpha$ smo preverjali pred in po krioprezervaciji/elektroporaciji. Pred krioprezervacijo smo testirali izražanje genov pri netretiranih celicah. Po krioprezervaciji pa smo testirali netretirane celice zamrznjene z DMSO, neelektroporirane v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 0 kV/cm) ter elektroporirane celice v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 1.5 kV/cm).

Elektroporacija je bila izvedena, kot je opisano v poglavju 3.3 Celična viabilnost pred in po krioprezervaciji oz. 3.3.1 Elektroporacija celičnih suspenzij, le da smo uporabili 250 mM trehalozo. Krioprezervacija je bila izvedena, kot je opisano v poglavju 3.3 Celična viabilnost pred in po krioprezervaciji oz. 3.3.2 Krioprezervacija celic.

Celice smo pred in po krioprezervaciji nasadili v gostoti 30.000 – 50.000 celic / cm² v dveh paralelkah na ploščo s 6 vdolbinicami v hranilnem mediju, ter jih inkubirali čez noč na 37 °C in 5 % CO₂. Naslednji dan smo celice ene paralelke aktivirali, tako da smo jim zamenjali gojišče z medijem, ki je vseboval DMEM/F-12, 1 ng/mL TNF α in 1 ng/mL IF γ . Drugi polovici, ki niso bile aktivirane, smo zamenjali gojišče z DMEM/F-12. Celice smo inkubirali 24 h na 37 °C in 5 % CO₂. Po 24 urah smo celicam za izolacijo RNA dodali lizirni pufer v skladu z navodili testa GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit ter celice zamrznili na –80 °C. RNA smo izolirali s kitom peqGOLD Total RNA (VWR). Koncentracijo RNA smo določili z NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis spektrofotometrom (Thermo Fisher Scientific). cDNA smo sintetizirali iz 125-500 ng RNA, odvisno od koncentracije posameznega vzorca RNA. Uporabili smo High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). qPCR smo pripravili s 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne) po navodilih proizvajalca. Analizirali smo naslednje gene: indoleamin-pirol 2,3-dioksigenaza (*ido1*), dejavnik tumorske nekroze alfa-induciran protein 6 (*tsg6*), interleukin 10 (*il10*), dejavnik tumorske nekroze alfa (*tnfa*), interleukin 6 (*il6*) in transformacijski rastni faktor beta 1 (*tgfb1*). Gen *gapdh* smo izbrali za referenčni gen. Začetni oligonukleotidi (Macrogen, Sigma-Aldrich) za merjenje genov so bili narejeni (IDO1-F: TGTCTGGCTGGAAAGGCAAC, IDO1-R: CTGAAAGACGCTGCTTTGGC, IL10-F: GTGATGCCCAAGCTGAGA, IL10-R: CACGGCCTTGCTCTTGT TTT, TNFA-F: TGGCCCAGGCAGTCAGATCA, TNFA-R: GGCGGTTTCAGCCACTGGAGC, IL6-F: GGC ACTGGCAGAAAACAACC, IL6-R: GCAAGTCTCCTCATTGAATCC, TGFB1-F: TGGACACCAACTATTGCTTCA, TGFB1-R: GGCAGAAGTTGGCATGGTAG) ali prevzeti iz prejšnjih študij (TSG6 (Kui in sod., 2017), GAPDH (Vandesompele in sod., 2002)).

Vsi qPCR poskusi so bili narejeni v triplikatih z LightCycler 480 Instrument II (Roche). Podatke genske ekspresije smo dobili iz standardne krivulje (program LightCycler 480, verzija 1.5.0). Vsi podatki so bili normalizirani na izražanje GAPDH. RQ vrednosti smo dobili z normalizacijo izražanja aktiviranih vzorcev na ne-aktivirane vzorce celic. Rezultati so predstavljeni kot Log₂(RQ).

3.8 ZAMRZOVANJE TKIVA POPKOVNICE Z ELEKTROPORACIJO IN TREHALOZO

Tkivo popkovnice smo pridobili ob porodu in ga najkasneje v 48 urah od odvzema obdelali. Vsi vzorci so bili prostovoljno darovani na podlagi pridobljenega dovoljenja Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko za namene raziskav podjetju Educell d. o. o. (KME 89/06/17).

Tkivo popkovnice smo pridobili od dveh različnih bioloških darovalcev (D1 in D2), kjer smo pri vsakem uporabili drugačno napetost elektroporacije (600 V oz. 800 V, kar je enako kot 1,5 kV/cm oz. 2 kV/cm). Viabilnosti tkiva smo ugotavljali pri tkivu pred in po

krioprezervaciji, pri čemer je bilo tkivo pred zamrzovanjem tretirano na različne načine, nato pa nasajeno v kulturo eksplanta (pred in po krioprezervaciji). Tkivo smo tretirali po naslednjih načinih:

- a) kontrola - netretirano tkivo (oz. zamrznjeno z DMSO),
- b) tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi (i30' + 250 TH),
- c) tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi, nato elektroporirano pri 1,5 (oz. 2) kV/cm (i30' + 250 TH + 1,5 (oz. 2) EP),
- d) tkivo elektroporirano pri 1,5 (oz. 2) kV/cm v 250 mM trehalozi, nato 30 minut inkubirano (1,5 (oz. 2) EP + 250 TH + i30').

Tkivo popkovnice smo obdelali tako, da smo tkivo vzdolžno prerezali in odstranili žile ter ga narezali na koščke velikosti $\varnothing = 5$ mm s pomočjo igle za biopsijo kože (Biopsy punch 5,0 mm, HS). Po 20 koščkov smo pripravili za vsak parameter (10 pred zamrzovanjem in 10 po odmrzovanju).

Eno polovico netretiranega tkiva a) smo nasadili v hranilnem mediju v gojilne ploščice z 24 vdolbinicami, vsakega v svojo vdolbinico. Drugo polovico smo zamrznili z 1 ml 10 % DMSO v 90 % FBS. Koščke tkiva smo prenesli v zamrzovalno posodico ter počasi po kapljicah dodajali zamrzovalni medij, ob tem pa nežno mešali. Zamrzovalne posodice smo takoj prestavili v posodo za kontrolirano zamrzovanje.

Tkivo b) smo prestavili v elektroporacijski pufer z 250 mM trehalozo ter ga 30 minut inkubirali na sobni temperaturi. Nato smo eno polovico nasadili v hranilni medij enako kot tkivo a). Drugo polovico smo zamrznili v enakem pufru, v katerem se je tkivo inkubiralo in sicer tako, da smo koščke prenesli v zamrzovalne posodice, jim dodali 1 ml puфра ter jih prestavili v posodo za kontrolirano zamrzovanje.

Tkivo c) smo pred elektroporacijo inkubirali 30 min na sobni temperaturi. Nato smo po 2 koščka tkiva prenesli v elektroporacijske kivete širine 4 mm in jih elektroporirali (elektroporator BTX, Gemini) v razmerah: 8 pulzov, 100 μ s, 1 Hz, pri napetostih 600 ali 800 V (kar ustreza 1,5 oz. 2 kV/cm jakosti električnega polja). Pri tem smo uporabili elektroporacijski medij, ki je vseboval DMEM/F-12 in 250 mM trehalozo. Po elektroporaciji smo eno polovico koščkov (10 koščkov) nasadili v hranilni medij enako kot tkivo a). Drugo polovico smo zamrznili po enakem postopku kot je opisano za tkivo b).

Tkivo d) smo najprej elektroporirali po enakem postopku kot je opisano pri tkivu c), ter ga nato inkubirali 30 min na sobni temperaturi. Nato smo eno polovico koščkov nasadili v hranilni medij, enako kot tkivo a). Drugo polovico smo zamrznili po enakem postopku kot je opisano za tkivo b).

Vse celice smo zamrznili v zamrzovalnih posodicah v posodi za kontrolirano zamrzovanje (Mr. Frosty) do temperature -80 °C s hitrostjo ohlajevanja -1 °C/min. Naslednji dan smo tkivo prestavili v pare tekočega dušika na -180 °C za vsaj en teden. Po enem tednu smo

koščke tkiva odmrznili. Tkivo smo odmrznili z dodatkom 7 – 10-kratnega volumna 100 mM trehaloze v DMEM/F-12 (temperature 37 °C) oz. kontrolne vzorce z 20 % FBS v DMEM/F-12 (temperature 37 °C). Po odmrzovanju smo medij sprali s centrifugiranjem na $500 \times g$, 5 min. Koščke tkiva smo nasadili v hranilni medij na ploščico z 24 vdolbinicami – vsakega v svojo vdolbinico.

Sveže koščke tkiva smo gojili 3 tedne, odmrznjene pa 4 tedne v hranilnem mediju ter ga na 3-4 dni zamenjali. Po nekaj dneh oz. tednih so iz nekaterih koščkov tkiva začele izraščati celice.

Po končanem gojenju smo celice – tkiva pobarvali z barvilom MTT (10 % MTT v DMEM) ter jih čez noč inkubirali na 37 °C in 5 % CO₂. Naslednji dan smo pod mikroskopom oz. lupo preverili tvorbo vijoličnih kristalov formazana, ki je potrdil prisotnost živih celic ter tkivo slikali.

3.9 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultati so podani kot aritmetična sredina \pm standardna napaka. Za določanje statistično značilna razlike med parametri smo uporabili statistični test z enofaktorsko analizo variance (angl. one-way ANOVA). Statistično značilne razlike so bile tiste, kjer je bil $P < 0,05$ (*). Posebej pa smo označili razlike, kjer je bil NS neznačilna razlika, $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) oz. $P < 0,0001$ (****). Za analizo podatkov in risanje grafov smo uporabili program GraphPad Prism, verzija 6.01 (GraphPad Software, Inc).

Za predstavitev podatkov genske ekspresije smo uporabili logaritemsko transformacijo, da smo dosegli normalno porazdelitev podatkov.

3.10 PRIPRAVA MEDIJEV

Hranilni medij z 10 % FBS (10 mL):

- 9 mL DMEM/F-12
- 1 mL FBS
- 10 μ L gentamicin
- 2 μ L bFGF (koncentracije 5 μ g/mL)

Standardni medij za zamrzovanje z 10 % DMSO (1 mL):

- 100 μ L DMSO
- 900 μ L FBS

Standardni medij za odmrzovanje z 20 % FBS (10 mL):

- 2 ml FBS
- 8 mL DMEM/F-12

Medij za odmrzovanje s 100 mM trehalozo (10 mL):

- 378 mg trehaloze
- do 10 mL DMEM/F-12

Elektroporacijski pufri:

Elektroporacijski puffer (100 mL)	K ₂ HPO ₄ (10 mM)	KH ₂ PO ₄ (10 mM)	MgCl ₂ (1 mM)	trehaloza	NaCl	dH ₂ O
Brez trehaloze	174,2 mg	136,1 mg	9,52 mg	/	169 mM	do 100 mL
10 mM trehaloza	174,2 mg	136,1 mg	9,52 mg	378 mg	162 mM	do 100 mL
50 mM trehaloza	174,2 mg	136,1 mg	9,52 mg	1,892 g	138 mM	do 100 mL
100 mM trehaloza	174,2 mg	136,1 mg	9,52 mg	3,783 g	110 mM	do 100 mL
250 mM trehaloza	174,2 mg	136,1 mg	9,52 mg	9,458 g	/	do 100 mL
400 mM trehaloza	174,2 mg	136,1 mg	9,52 mg	15,133 g	/	do 100 mL

Elektroporacijski puffer za tkivo s 250 mM trehalozo (10 mL):

- 946 mg trehaloze
- do 10 mL DMEM/F-12

Indukcijski mediji:

Adipogeni gojilni medij:

- DMEM/F-12,
- 5 % FBS,
- 2 mM L-glutamina,
- 10 µg/mL inzulina,
- 1 µM deksametazona,
- 100 µM indometacina,
- 500 µM IBMX,
- 50 µg/mL gentamicina.

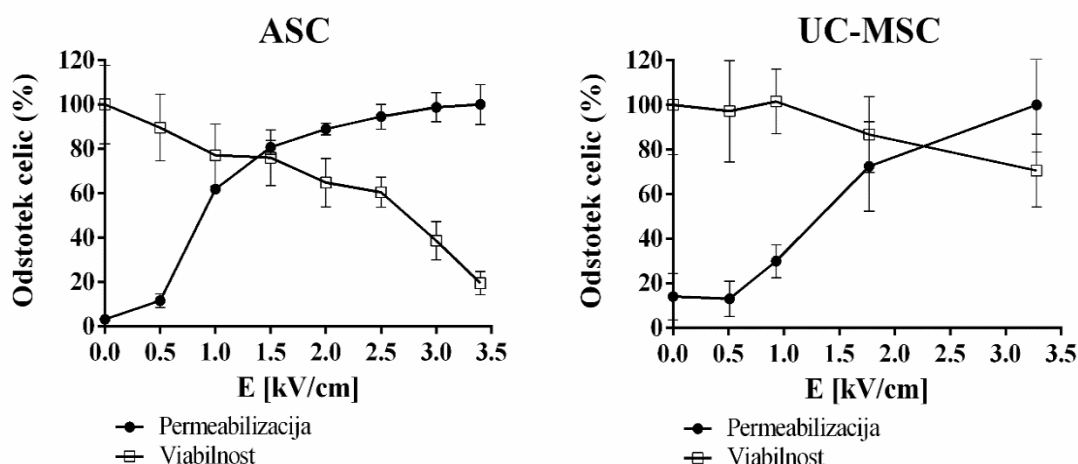
Osteogeni gojilni medij:

- 5 % FBS,
- 20 µL/mL L-glutamina,
- askorbinska kislina,
- deksametazon,
- beta glicerofosfat,
- 50 µg/mL gentamicina.

4 REZULTATI

4.1 PERMEABILIZACIJA CELIČNE MEMBRANE Z ELEKTROPORACIJO

Prvi set poskusov smo opravili, da bi izbrali amplitudo električnih pulzov, ki zagotavlja učinkovito prehajanje trehaloze v celico, pri čemer bi ohranili čim večjo viabilnost celic. Celično permeabilizacijo smo testirali z vnosom PI v celice. Vzporedno smo testirali tudi celično viabilnost s testom MTT. Uporabili smo različne jakosti električnega polja; pri celicah ASC smo celice elektroporirali pri 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,25 kV/cm, celice UC-MSC pa pri 0, 0,5, 1, 1,75, 3,25 kV/cm. Da smo ohranili izotoničnost elektroporacijskega pufera, smo izbrali 250 mM koncentracijo trehaloze. Iz Slike 6 je razvidno, da se z večanjem jakosti električnega polja povečuje tudi permeabilizacija PI v celice. Vzporedno pa lahko vidimo, da z večanjem jakosti električnega polja viabilnost celic upada. Pri obeh celičnih tipih permeabilizacija doseže največji preskok med 0,5 in 1,5 kV/cm, plato pa nekje nad oziroma med 1,5 in 2 kV/cm. Ti rezultati kažejo, da z višanjem jakosti električnega polja ne dosežemo znatno boljšega vnosa PI v celice. Pri okrog 1,5 kV/cm je večina celic permeabiliziranih in dovolj celic viabilnih, zato smo to točko izbrali kot optimalno. Za nadaljnje poskuse smo zato izbrali optimalno jakost električnega polja pri 1,5 kV/cm.



Slika 6: Permeabilizacija (%) in viabilnost (%) celic ASC in UC-MSC po elektroporaciji. Pri obeh tipih celic opazimo, da se odstotek permeabilizacije z večanjem jakosti električnega polja povečuje, odstotek viabilnosti celic pa upada. ASC smo izpostavili jakosti električnega polja pri 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 kV/cm ($n = 4$). UC-MSC smo izpostavili 0, 0,5, 1, 1,75 in 3,25 kV/cm ($n = 3$). Elektroporacijski pufer je vseboval 250 mM trehalozo. Optimalno jakost električnega polja za elektroporacijo smo izbrali pri 1,5 kV/cm.

Figure 6: Permeabilization (%) and viability (%) of ASC and UC-MSC after electroporation. For both cell types % permeabilization increases with higher voltages, while cell viability decreases. ASC were exposed to 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 kV/cm of electric field ($n = 4$). UC-MSC were exposed to 0, 0.5, 1, 1.75 and 3.25 kV/cm of electric field ($n = 3$). Electroporation buffer with 250 mM trehalose was used. Based on the results optimal electric field of 1.5 kV/cm was chosen.

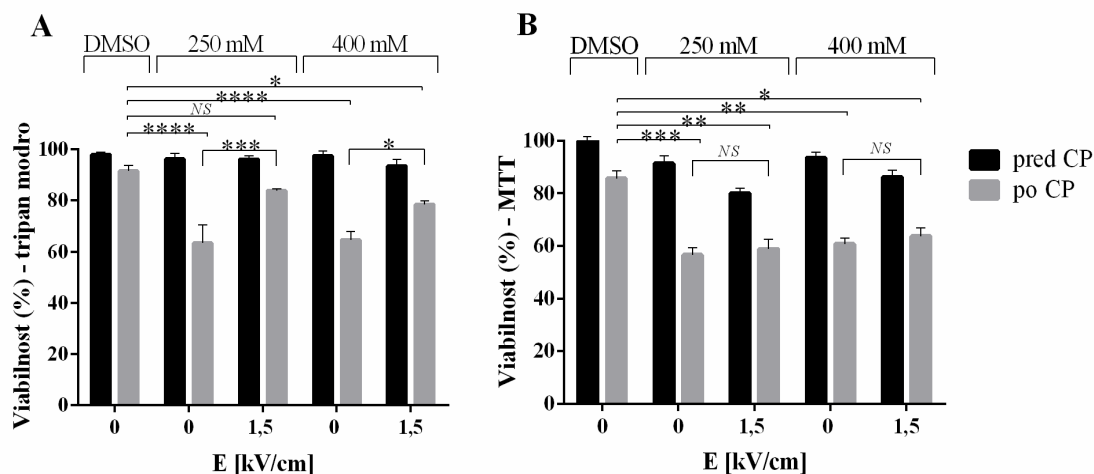
4.2 CELIČNA VIABILNOST PRED IN PO KRIOPREZERVACIJI CELIC Z UPORABO ZUNAJCELIČNE TREHALOZE

4.2.1 Viabilnost celic ASC z uporabo 250 mM in 400 mM trehaloze v puftru

Za zamrzovanje celic ASC smo izbrali koncentracijo trehaloze v puftru 250 mM in 400 mM. Pri koncentraciji 250 mM zagotovimo izoosmotsko okolje (~290 mOsm/kg) in preprečimo osmotski šok. Za primerjavo smo izbrali hiperosmotsko koncentracijo trehaloze pri 400 mM (~410 mOsm/kg). Celice smo elektroporirali v prisotnosti dveh različnih pufrov in celice zamrzili. Da bi testirali efekt učinkovitosti vnosa trehaloze v celice z elektroporacijo, smo zamrzili tudi celice v prisotnosti istih pufrov, vendar brez elektroporacije. Za kontrolni protokol smo zamrzili celice z 10 % DMSO. Pred in po odmrzovanju smo preverjali celično viabilnost s testoma tripan modrim ter MTT.

Celična viabilnost ASC pred in po zamrzovanju, ki smo jo preverjali s štetjem s tripan modrim (Slika 7A), znaša pred zamrzovanjem okrog 100 % pri vseh izmerjenih parametrih. Elektroporacija ni imela negativnega vpliva na viabilnost celic. Po odmrzovanju je viabilnost neelektroporiranih celic približno 64 % pri obeh koncentracijah trehaloze. Večjo viabilnost smo opazili pri celicah, ki so bile elektroporirane, in sicerje bila pri 250 mM trehalozi viabilnost 84 %, pri 400 mM trehalozi pa 78 %. Z elektroporacijo smo dosegli večjo viabilnost celic po odmrzovanju, kot pa pri neelektroporiranih celicah. Rezultati so pokazali, da je protokol zamrzovanja primerljiv s kontrolnim protokolom z DMSO (92 %). Razlike med zamrzovanjem v prisotnosti 250 mM trehaloze ali 400 mM v kombinaciji z elektroporacijo nismo zaznali. Višja koncentracija trehaloze v puftru torej ne doprinese k višji viabilnosti ASC po odmrzovanju.

Pri testu viabilnosti s testom MTT (Slika 7B) so testirani vzorci pred zamrzovanjem primerljivi s kontrolnim in skoraj vse celice so žive. Po odmrzovanju pa razlike med elektroporiranimi in neelektroporiranimi celicami ne opazimo. Statistično značilna višja viabilnost je pri zamrzovanju z DMSO v primerjavi s tretiranimi celicami s trehalozo ter z in brez elektroporacije. Tudi tu ne opazimo znatne razlike med 250 in 400 mM trehalozo po odmrzovanju.



Slika 7: Celična viabilnost (%) ASC določena s testoma barvanje s tripan modrim (A) in MTT (B). Pred zamrzovanjem (pred CP) in po odmrzovanju (po CP) brez elektroporacije v prisotnosti 250 ali 400 mM trehaloze (TH + 0 kV/cm) ali z elektroporacijo v prisotnosti 250 ali 400 mM trehaloze (TH + 1,5 kV/cm). (A) Celična viabilnost (%) z barvanjem s tripan modrim pred zamrzovanjem celic znaša okoli 100 %, skoraj vse celice so žive. Po odmrzovanju je celična viabilnost višja pri elektroporiranih celicah kot pri neelektroporiranih. Elektroporirane celice dosegajo podobno preživetje kot z zamrzovanjem s kontrolnim DMSO. Podobne rezultate smo dobili pri 250 mM in 400 mM trehalozi. ($n = 3 \pm SE$). (B) Celična viabilnost s testom MTT je pred zamrzovanjem vzorcev zamrznjenih s trehalozo primerljiva s kontrolo, skoraj vse celice so žive. Po odmrzovanju ne opazimo razlike v viabilnosti med elektroporiranimi in neelektroporiranimi celicami ter odstotek viabilnosti je nižji kot pri DMSO. Poskus je bil narejen v treh neodvisnih ponovitvah. NS – nesignifikantne razlike; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (enofaktorska analiza variance ANOVA).

Figure 7: Cell viability (%) of ASC assessed with trypan blue (A) and MTT (B). Before (pred CP) and after (po CP) cryopreservation without electroporation in the presence of 250 or 400 mM trehalose (TH + 0 kV/cm) or with electroporation in the presence of 250 or 400 mM trehalose (TH + 1.5 kV/cm). (A) Cell viability (%) assessed with trypan blue before cryopreservation is around 100%, almost all cells were alive. After thawing cell viability was lower at non-electroporated cells in comparison to DMSO treated cells. Cell viability when using electroporation was almost as high as in the control. Similar results were obtained with 250 mM and 400 mM trehalose. Cryopreservation with DMSO represents the control protocol. ($n = 3 \pm SE$). (B) Cell viability (%) before cryopreservation assessed with MTT, is comparable to control – almost all cells were alive. After thawing, no difference between electroporated and nonelectroporated cells is seen; however the values are lower than control. Control represents cells cryopreserved with DMSO. Experiment was performed in three independent repetitions. Here NS not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (One-way parametric ANOVA test).

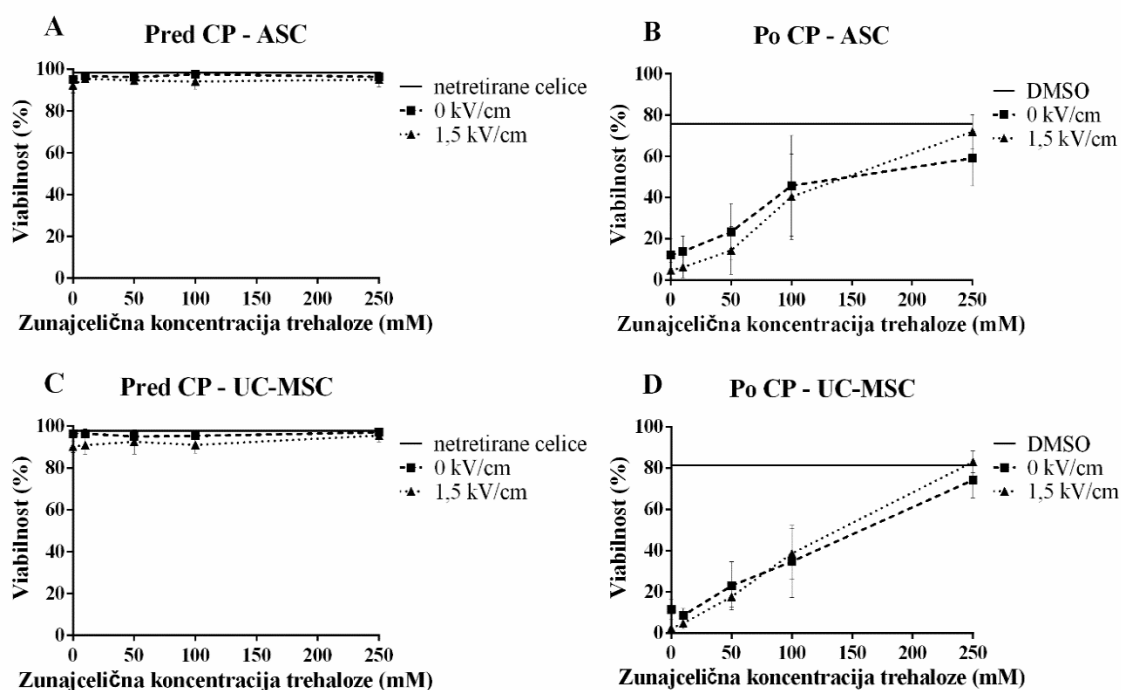
4.2.2 Koncentracija zunajcelične trehaloze od 0 do 250 mM

Nadalje smo testirali celično viabilnost pred in po krioprezervaciji z naraščajočimi koncentracijami zunajcelične trehaloze od 0 do 250 mM, v kombinaciji z ali brez

elektroporacije ter s kontrolnim protokolom z DMSO. Celično viabilnost smo testirali na obeh celičnih tipih ASC in UC-MSC s testoma tripan modrim in MTT.

Iz slike 8A vidimo, da pred zamrzovanjem različna koncentracija trehaloze ne vpliva na celično viabilnost (določeno s testom tripan modro), pri obeh celičnih tipih in tako pri elektroporiranih kot neelektroporiranih celicah. Po odmrzovanju (Slika 8B) pa viabilnost narašča z naraščajočo koncentracijo trehaloze. Pri 10 mM trehalozi je viabilnost podobna kot brez trehaloze (0 mM). Pri 50 mM trehalozi viabilnost naraste na okoli 20 %, pri 100 mM trehalozi pa na 40 – 50 %. Viabilnost celic pri 250 mM trehalozi in elektroporaciji naraste na 72 % pri ASC in 83 % pri UC-MSC, kar je primerljivo s kontrolo (74 % pri ASC in 81 % pri UC-MSC). Pri 250 mM trehalozi in elektroporiranih celicah pa viabilnost naraste za približno 10 % pri ASC v primerjavi z neelektroporiranimi. Statistično značilne razlike v viabilnosti med elektroporiranimi in neelektroporiranimi celicam po odmrzovanju pri koncentraciji trehaloze 250 mM nismo dobili, kljub temu pa P-vrednosti niso bile visoke; $P = 0,16$ pri celicah ASC in $P = 0,15$ pri UC-MSC (enofaktorska analiza variance ANOVA).

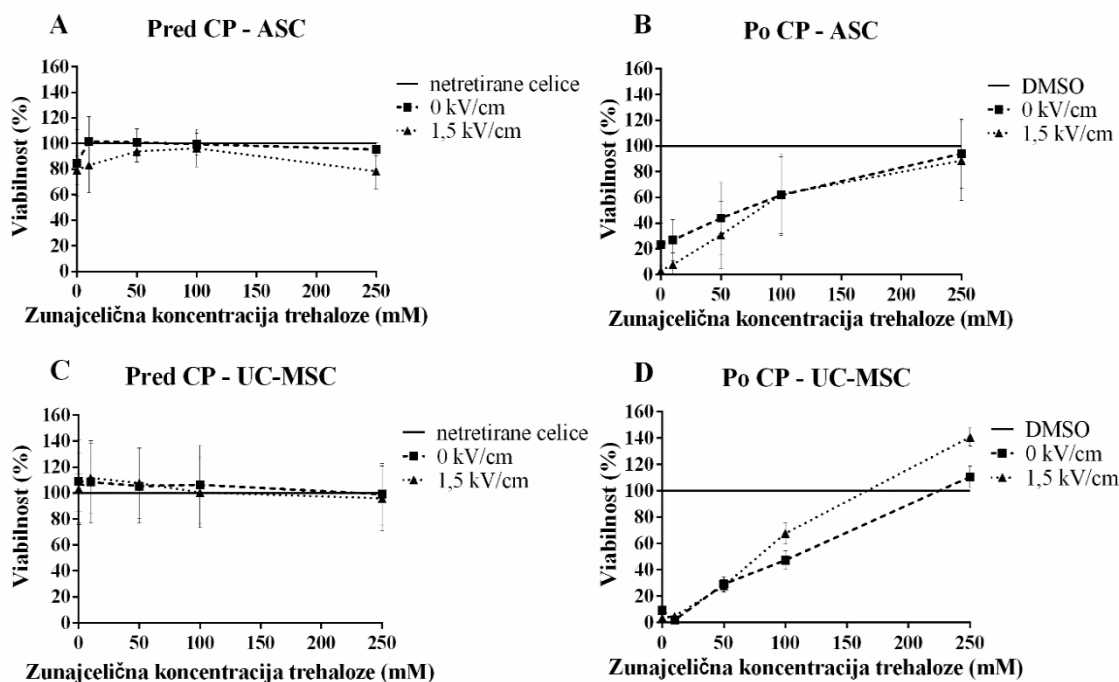
Podobne rezultate viabilnosti, tako pred zamrzovanjem kot po odmrzovanju smo opazili tudi s testom MTT (Slika 9C in D). Pred zamrzovanjem (Slika 9C) se % viabilnosti ne spreminja z naraščajočo koncentracijo zunajcelične trehaloze. Po odmrzovanju pa opazimo naraščajoči trend odvisnosti viabilnosti od koncentracije trehaloze. Pri celicah UC-MSC po odmrzovanju smo dobili celo višjo viabilnost kot pri kontrolnem zamrzovanju z DMSO.



Slika 8: Celična viabilnost (%) ASC (A in B) in UC-MSC (C in D) določena s testom tripan modro. Pred zamrzovanjem (pred CP) (A in C) in po odmrzovanju (po CP) (B in D), v odvisnosti od naraščajoče

zunajcelične koncentracije trehaloze, brez (0 kV/cm) ali z (1,5 kV/cm) elektroporacijo v primerjavi z DMSO oz. netretiranimi celicami. Pred krioprezervacijo ne opazimo razlik v celični viabilnosti v odvisnosti od naraščajoče zunajcelične koncentracije trehaloze. Po odmrzovanju odstotek viabilnosti narašča z naraščajočo zunajcelično koncentracijo trehaloze, tako pri neelektroporiranih kot pri elektroporiranih celicah. Pri zamrzovanju z 250 mM trehalozo in elektroporacijo je viabilnost celic primerljiva s kontrolnim zamrzovanjem z DMSO. Podobne rezultate smo dobili pri obeh tipih celic. Prikazani rezultati so srednja vrednost s standardno napako vsaj treh neodvisnih poskusov.

Figure 8: Cell viability (%) of ASC (A and B) and UC-MS-C (C and D) assessed with trypan blue. Before (A and C) and after (B and D) cryopreservation (CP) as a function of extracellular trehalose concentration, without (0 kV/cm) and with (1.5 kV/cm) electroporation, in comparison to DMSO protocol. Before cryopreservation no concentration dependence is observed. After cryopreservation % of cell viability is increasing with increasing extracellular trehalose concentration. Mean values with SE of at least three independent experiments are presented.



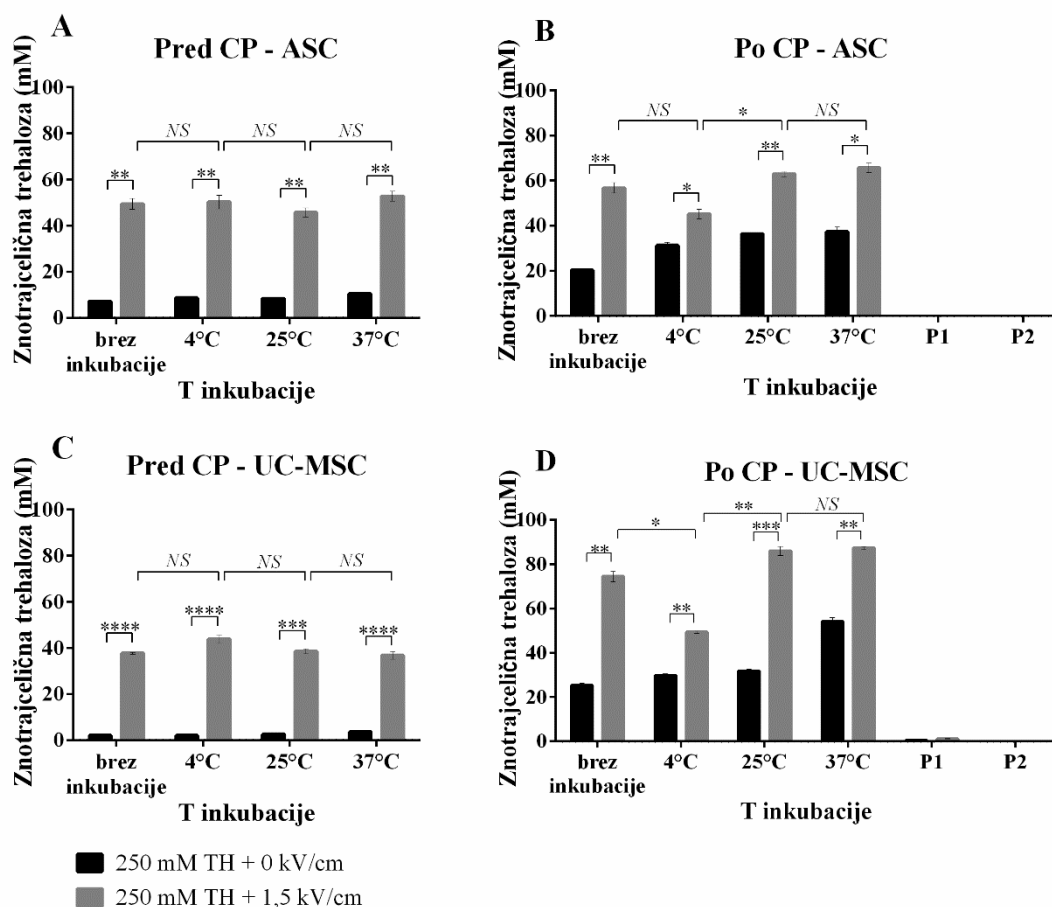
Slika 9: Celična viabilnost (%) ASC (A in B) in UC-MS-C (C in D), določena z testom MTT. Pred zamrzovanjem (pred CP) (A in C) in po odmrzovanju (po CP) (B in D) v odvisnosti od naraščajoče zunajcelične koncentracije trehaloze, brez (0 kV/cm) ali z (1,5 kV/cm) elektroporacijo, v primerjavi z DMSO oz. netretiranimi celicami. Pred krioprezervacijo ne opazimo razlik v celični viabilnosti v odvisnosti od naraščajoče zunajcelične koncentracije trehaloze. Po odmrzovanju odstotek viabilnosti narašča z naraščajočo zunajcelično koncentracijo trehaloze, tako pri neelektroporiranih kot elektroporiranih celicah. Prikazani rezultati so srednja vrednost s standardno napako vsaj treh neodvisnih poskusov

Figure 9: Cell viability (%) of ASC (A and B) and UC-MS-C (C and D), assessed with MTT assay. Before (A and C) and after (B and D) cryopreservation (CP) as a function of extracellular trehalose concentration, without (TH + 0 kV/cm) and with (TH + 1.5 kV/cm) electroporation, in comparison to DMSO protocol. Before

cryopreservation no concentration dependence is observed. After cryopreservation % of cell viability is increasing with increasing extracellular trehalose concentration. Mean values with SE of at least three independent experiments are presented.

4.3 DOLOČANJE ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE TREHALOZE

Znotrajcelično trehalozo smo izmerili pri elektroporiranih in neelektroporiranih celicah pred in po odmrzovanju. Pred zamrzovanjem smo celice inkubirali v prisotnosti 250 mM zunajcelične trehaloze pri različnih temperaturah. Iz slike 10 vidimo pred zamrzovanjem značilno razliko v znotrajcelični koncentraciji trehaloze med neelektroporiranimi in elektroporiranimi celicami. Pri elektroporiranih vzorcih smo izmerili približno 50 mM znotrajcelično trehalozo pri celicah ASC oziroma 40 mM pri celicah UC-MSK, medtem ko smo pri neelektroporiranih celicah izmerili manj kot 10 mM znotrajcelične koncentracije trehaloze. Po odmrzovanju pri neelektroporiranih celicah je koncentracija znotrajcelične trehaloze pri neinkubiranih celicah narasla na več kot 20 mM ter je naraščala z naraščajočo inkubacijsko temperaturo, kjer smo največji vnos trehaloze, okrog 40 oz. 50 mM, opazili pri temperaturi 37 °C. Pri elektroporiranih celicah smo po odmrzovanju ravno tako dobili višje vrednosti kot pred zamrzovanjem, razen pri inkubaciji pri 4 °C, ko je znotrajcelična trehaloza pri elektroporiranih celicah ostala podobna kot pred zamrzovanjem. Po odmrzovanju je pri neinkubiranih celicah znotrajcelična koncentracija trehaloze narasla na okrog 60 oziroma 70 mM pri celicah ASC oziroma UC-MSK. Tudi pri celicah inkubiranih pri 25 oziroma 37 °C je koncentracija trehaloze narasla na 70 oziroma 90 mM tako pri celicah ASC, kot pri UC-MSK. Ravno tako tudi pri elektroporiranih celicah znotrajcelična koncentracija trehaloze narašča z naraščajočo inkubacijsko temperaturo. Pri vseh testiranih vzorcih temperatura inkubacije pred zamrzovanjem ni imela bistvenega vpliva na prehodnost membrane za trehalozo. Kljub temu pa pri neelektroporiranih celicah opazimo rahlo naraščanje vrednosti z naraščanjem temperature. Izmerili smo tudi znotrajcelično koncentracijo trehaloze po krioprezervaciji in po gojenju obeh celičnih tipov v dveh nadaljnjih pasajah (P1 in P2), pri elektroporiranih in neelektroporiranih celicah v prisotnosti 250 mM trehaloze, kjer pa že po prvi pasaži trehaloze praktično nismo zaznali. Da smo preverili ali se vsa trehaloza razgradi v glukozo, smo razgradili tudi trehalozo v pufru brez celic. Pri 100 mM trehalozni smo po razgradnji in preračunu dobili primerljivo koncentracijo, 108 mM, po 250 mM pa nekoliko manj, 202 mM. Kljub temu, da se 250 mM trehaloza v raztopini očitno ni v celoti razgradila, smo pri testiranih vzorcih v celicah dobili nižje vrednosti, kar ne vpliva na končni rezultat znotrajcelične koncentracije trehaloze določene pri testiranih vzorcih. Pri kontrolnem vzorcu netretiranih celic (oz. zamrznjenih z DMSO) smo izmerili vrednosti glukoze, ki so znašale okrog 1 mM tako pri celicah ASC, kot pri UC-MSK.



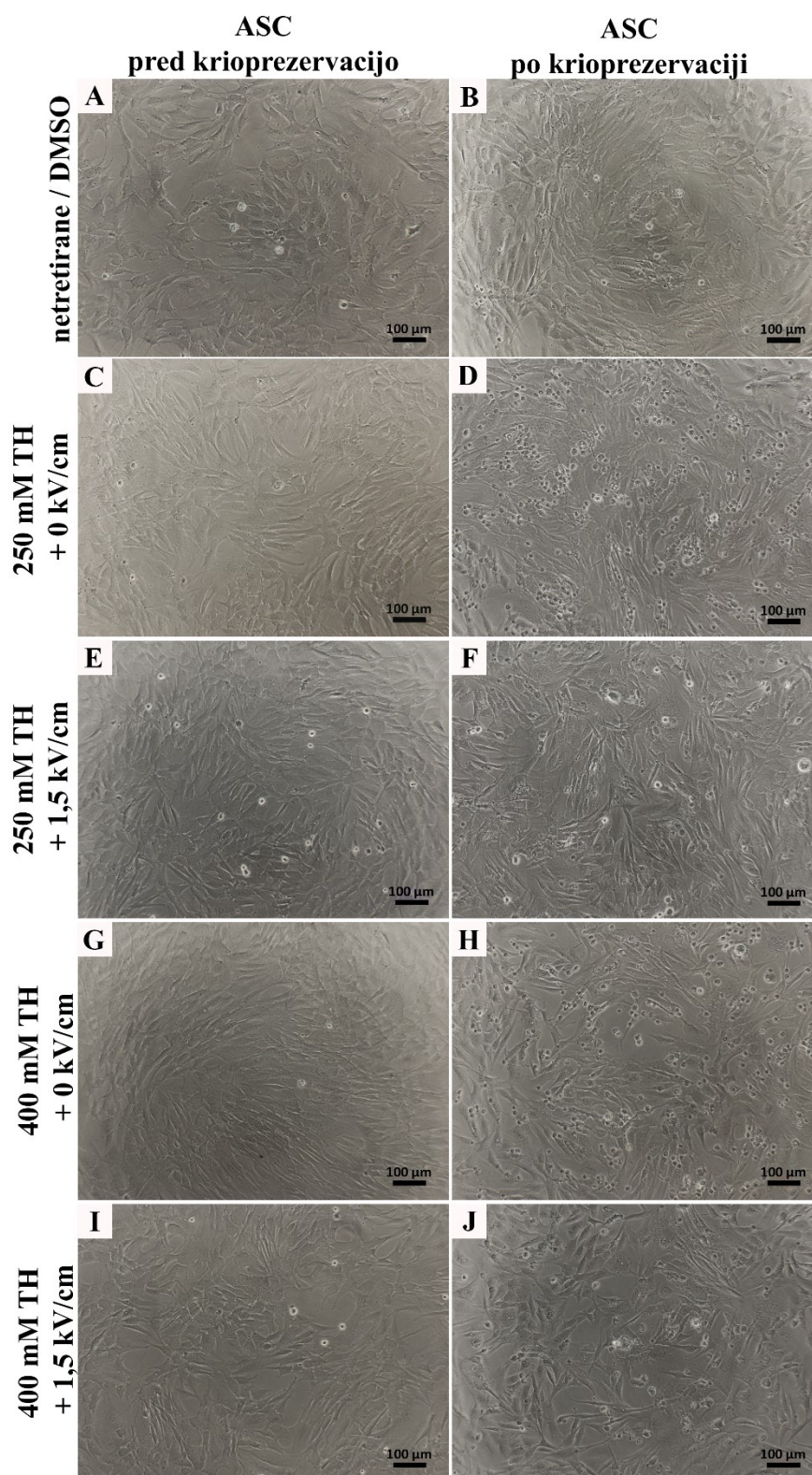
Slika 10: Določanje znotrajcelične koncentracije trehaloze (mM) ASC (A in B) in UC-MSC (B in C). Pred (A in C) in po (B in D) krioprezervaciji (CP), brez (250 mM TH + 0 kV/cm) ali z (250 mM TH + 1,5 kV/cm) elektroporacijo pri različnih temperaturah. Celice ASC in UC-MSC smo inkubirali pri različnih temperaturah. Z uporabo elektroporacije vnesemo bistveno več v trehaloze v celice, medtem ko pri inkubaciji pri različnih temperaturah ne opazimo razlik. Po gojenju v prvi in drugi pasaži (P1 in P2) znotrajcelične trehaloze nismo zaznali. Prikazani rezultati so srednja vrednost s standardno napako treh tehničnih ponovitev. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (enosmerni ANOVA parametrični test).

Figure 10: Determination of intracellular trehalose concentration (mM) of ASC (A and B) and UC-MSC (B and C). Before (A and C) and after (B and D) cryopreservation (CP), without (250 mM TH + 0 kV/cm) or with (250 mM TH + 1.5 kV/cm) electroporation at different incubation temperature. There is significant trehalose uptake using electroporation and no significant differences between different incubation temperatures. After cultivation in two passages (P1 and P2) intracellular trehalose was not detected. Mean values with SE of three technical replicates are presented. Here NS not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (One-way parametric ANOVA test).

4.4 CELIČNA MORFOLOGIJA IN DIFERENCIACIJA

Celično morfologijo (obliko celic) smo redno preverjali pred in po krioprezervaciji tako pri kontrolnih (netretiranih oz. zamrznjenih z DMSO) vzorcih kot pri elektroporiranih in

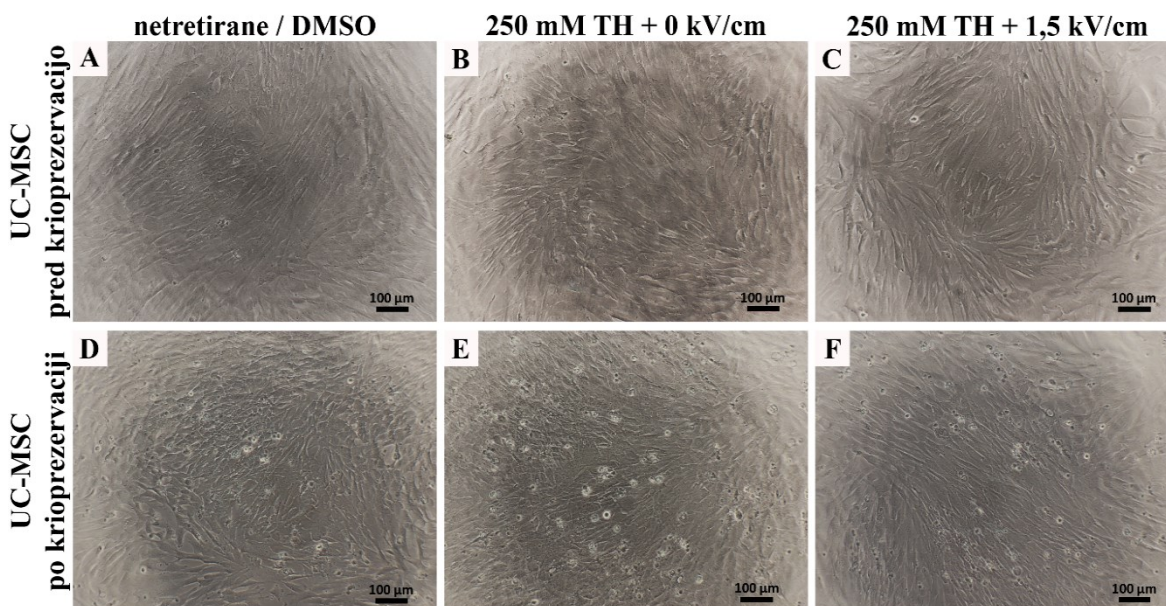
neeлектроporiranih celicah. Na sliki 11 je predstavljena morfologija celic ASC: kontrolnih (netretiranih oz. DMSO), neelektroporiranih (250 mM TH + 0 kV/cm) ter elektroporiranih (250 mM TH + 1,5 kV/cm) v prisotnosti 250 mM trehaloze ter neelektroporiranih (400 mM TH + 0 kV/cm) ter elektroporiranih (400 mM TH + 1,5 kV/cm) v prisotnosti 400 mM trehaloze pred in po krioprezervaciji. Iz slike je razvidno, da tudi po elektroporaciji (Slika 11F in J) in krioprezervaciji (Slika 11B, D, F, H, J) ohranijo celice značilno morfologijo matičnih celic, ki je primerljiva z netretiranimi celicami (Slika 11A). Po krioprezervaciji zaznamo nižjo celično viabilnost pri tretiranih celicah s trehalozo in z (Slika 11F in J) ali brez elektroporacije (Slika 11D in H), kar se kaže tudi pri morfologiji, saj so prisotne tudi okrogle nepritrjene mrtve celice. Opazna je razlika pri celicah zamrznjenih s trehalozo in elektroporacijo (Slika 11F in J) in neelektroporiranih celicah, saj je pri prvih manj mrtvih – okroglih celic (Slika 11D in H). Razlik v morfologiji med celicami v 250 in 400 mM trehalozi ne opazimo. Podobne rezultate smo dobili tudi pri celicah UC-MSK, ki so prikazani na sliki 12, le da smo tam uporabili le 250 mM trehalozo in ne tudi 400 mM.



Slika 11: Celična morfologija ASC. (A, B) Kontrolne – netretirane celice (oz. zamrznjene z DMSO), (C, D) neelektroporirane celice v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 0 kV/cm), (E, F) elektroporirane celice v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 1,5 kV/cm), (G, H) neelektroporirane celice v prisotnosti 400

mM trehaloze (400 mM TH + 0 kV/cm), (I, J) elektroporirane celice v prisotnosti 400 mM trehaloze (400 mM TH + 1,5 kV/cm) pred (prvi stolpec) in po (drugi stolpec) krioprezervaciji. Pred krioprezervacijo imajo vse celice enako morfologijo (obliko), ki je podobna morfologiji netretiranih celic. Po krioprezervaciji opazimo več okroglih – mrtvih celic pri celicah zamrznjenjih z 250 ali 400 mM trehalozo brez elektroporacije (D, H) in nekoliko manj pri celicah zamrznjenjih z 250 ali 400 mM trehalozo z elektroporacijo (F, J) v primerjavi z celicami zamrznjenimi z DMSO (B). Slike so bile posnete s kamero pod invertnim mikroskopom Nikon, merilce predstavlja 100 μ m.

Figure 11: Cell morphology of ASC. (A, B) Control – nontreated cells (or cryopreserved with DMSO), (C, D) non-electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose (250 mM TH + 0 kV/cm) and (E, F) electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose (250 mM TH + 1.5 kV/cm), (G, H) non-electroporated cells in the presence of 400 mM trehalose (400 mM TH + 0 kV/cm) and (I, J) electroporated cells in the presence of 400 mM trehalose (400 mM TH + 1.5 kV/cm) before (first column) and after (second column) cryopreservation. Before cryopreservation all treated cells have the same morphology as the control - nontreated cells. After thawing there are more round (dead) cells in non-electroporated using 250 or 400 mM trehalose (D, H) and less round cells cryopreserved with electroporation and 250 or 400 mM trehalose (F, J) in comparison to control (B) cells cryopreserved using DMSO. Photographs were made with inverted microscope Nikon, scale bar represents 100 μ m.



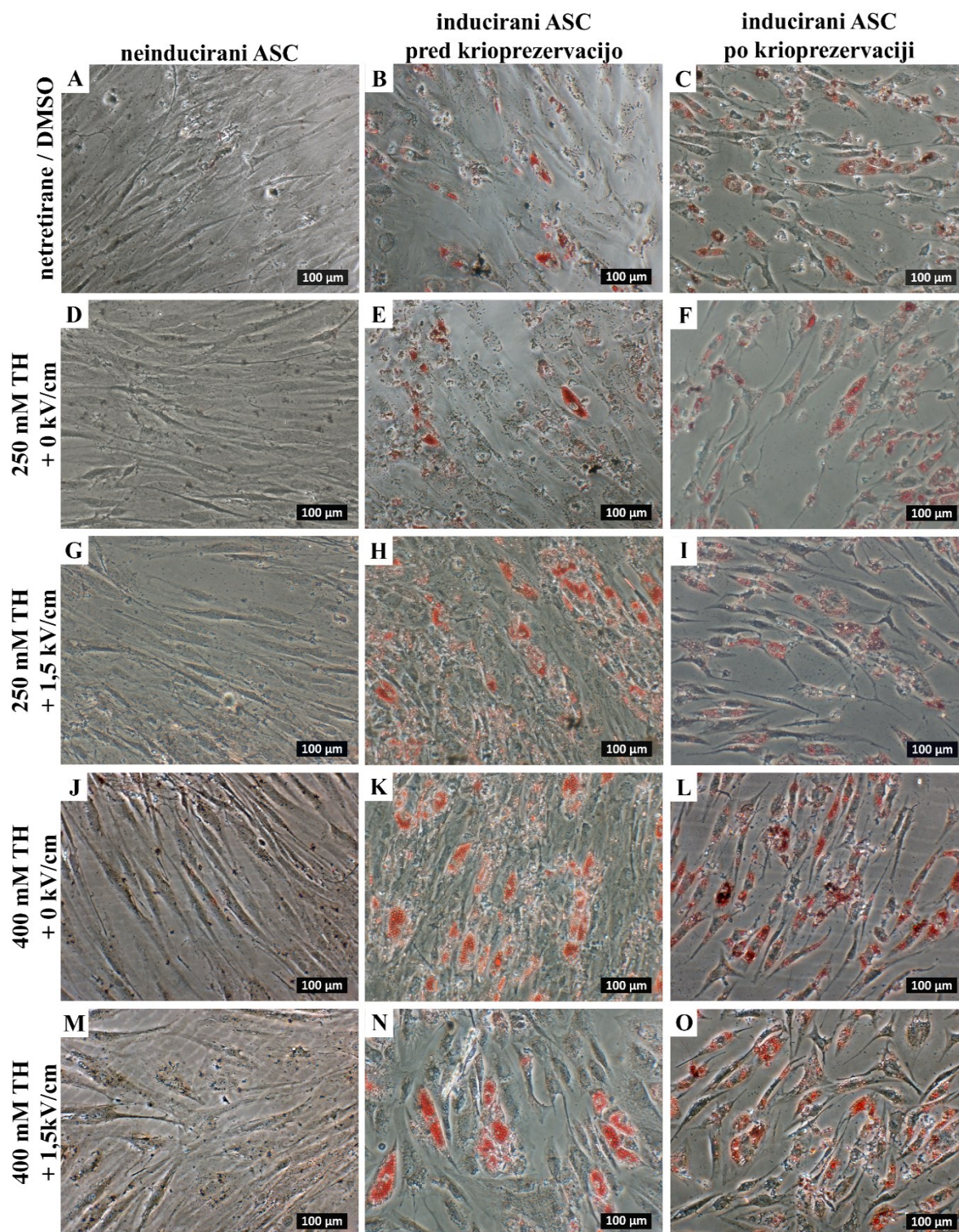
Slika 12: Celična morfologija UC-MSC. (A, D) Kontrolne – netretirane celice (oz. zamrznjene z DMSO), (B, E) neelektroporirane celice v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 0 kV/cm) ter (C, F) elektroporirane celice v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 1,5 kV/cm) pred (A-C) in po (D-F) krioprezervaciji. Pred krioprezervacijo imajo vse celice enako morfologijo (obliko) v primerjavi z netretiranimi celicami. Po krioprezervaciji opazimo več okroglih – mrtvih celic pri celicah zamrznjenjih z 250 mM trehalozo brez elektroporacije (E) in nekoliko manj pri celicah zamrznjenjih z 250 mM trehalozo z elektroporacijo (F) v primerjavi s celicami zamrznjenimi z DMSO (D). Slike so bile posnete s kamero pod invertnim mikroskopom Nikon, merilce predstavlja 100 μ m.

Figure 12: Cell morphology of UC-MSC. (A, D) Control – nontreated cells (or cryopreserved with DMSO), (B, E) non-electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose (250 mM TH + 0 kV/cm) and (C, F)

electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose (250 mM TH + 1.5 kV/cm) before (A-C) and after (D-F) cryopreservation. Before cryopreservation all treated cells have the same morphology as the control - nontreated cells. After thawing there are more round (dead) cells in electroporated (F) sample in comparison to control (D) cells cryopreserved using DMSO. Non-electroporated (E) sample has more dead cells than electroporated (F) sample. Photographs were made with inverted microscope Nikon, scale bar represents 100 μm .

Testirali smo različno celično funkcionalnost po različnih tretiranjih. Na sliki 13 so prikazani rezultati adipogene diferenciacije po odmrzovanju ASC oz. na sliki 14 celice UC-MSK, na slikah 15 in 16 pa rezultati osteogene diferenciacije ASC in UC-MSK. Celice ASC smo v prisotnosti 250 in 400 mM trehaloze elektroporirali pri 1,5 kV/cm ali so bile neelektroporirane. Osteogeno in adipogeno diferenciacijo smo izvedli tako pred kot po odmrzovanju in sicer pri celicah, ki so bile izpostavljene 250 ali 400 mM trehalozi brez elektroporacije (250 mM + 0 kV/cm oz. 400 mM + 0 kV/cm), celicah v prisotnosti 250 in 400 mM trehaloze in elektroporacije pri 1,5 kV/cm (250 mM + 1,5 kV/cm oz. 400 mM + 1,5 kV/cm) ter pri kontrolnih celicah, ki so bile netretirane oz. zamrznjene z DMSO. Celice UC-MSK so bile tretirane samo z 250 mM trehalozo in ne tudi s 400 mM.

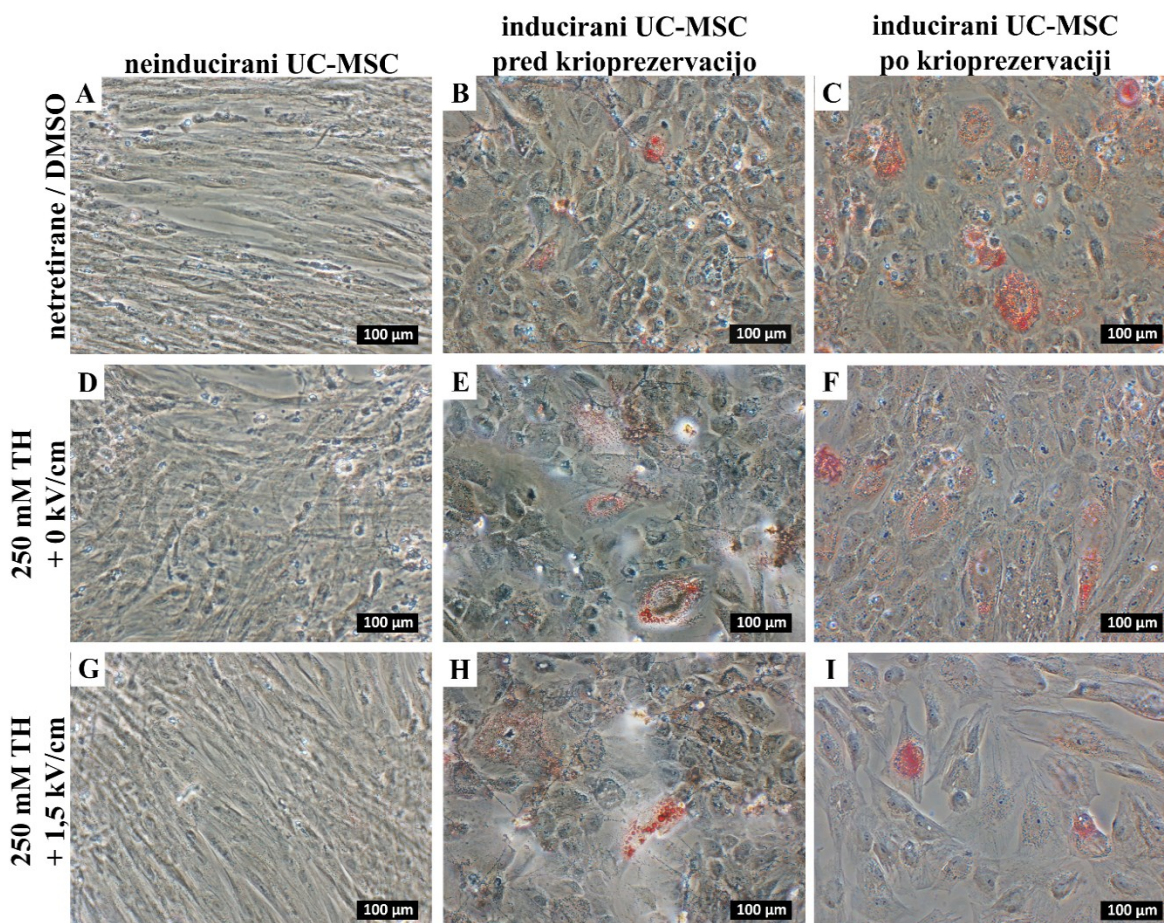
Na slikah 13 in 14 so prikazani rezultati ASC in UC-MSK adipogene diferenciacije po odmrzovanju. V prvem stolpcu so nediferencirane celice v neinduciranem – kontrolnem mediju. V drugem stolpcu so celice pred zamrzovanjem gojene v indukcijskem adipogenem mediju, kjer so se celice diferencirale, v tretjem stolpcu pa so celice po krioprezervaciji, ravno tako v indukcijskem adipogenem mediju. Pri vseh induciranih parametrih smo opazili tvorbo rdeče obarvanih maščobnih kapljic. To pomeni, da so celice ohranile funkcionalne sposobnosti in so se uspešno diferencirale v adipogeno linijo. Enake rezultate smo pridobili pred in po krioprezervaciji. Celice ASC so se uspešno difrencirale tako v 250 mM kot v 400 mM trehalozi (Slika 13).



Slika 13: Adipogena diferenciacija celic ASC pred in po krioprezervaciji. Kontrolne netretirane celice oz. zamrznjene z DMSO (A–C), neelektroporirane v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 0 kV/cm) (D–F), elektroporirane celice v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 1,5 kV/cm) (G–I), neelektroporirane celice v prisotnosti 400 mM trehaloze (400 mM TH + 0 kV/cm) (J–L) in elektroporirane celice v prisotnosti 400 mM trehaloze (400 mM TH + 1,5 kV/cm) (M–O). Neinducirane celice so prikazane na slikah v prvem stolpcu, inducirane v adipogenem mediju pred zamrzovanjem v drugem stolpcu ter inducirane v adipogenem

mediju po zamrzovanju v tretjem stolpcu. Celice so bile nasajene v gojilno posodo v kontrolno ali adipogeno gojišče. Po 14-ih dneh smo celice fiksirali ter barvali z Oil Red O. Rdeče so se obarvale maščobne kapljice pri adipogeno diferenciranih celicah. Na sliki vidimo, da so se vse inducirane celice, tretirane pod različnimi pogoji, adipogeno diferencirale. Slike so bile posnete s kamero pod invertnim mikroskopom Nikon, merilce predstavlja 100 μm .

Figure 13: Adipogenic differentiation of ASC before and after cryopreservation. Control non-treated cells or cryopreserved with DMSO (A–C), non-electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose (250 mM TH + 0 kV/cm) (D–F), electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose (250 mM TH + 1.5 kV/cm) (G–I), non-electroporated cells in the presence of 400 mM trehalose (400 mM TH + 0 kV/cm) (J–L) and electroporated cells in the presence of 400 mM trehalose (400 mM TH + 1.5 kV/cm) (M–O). Cells were seeded into culture wells for adipogenic differentiation. In the first column are non-induced cells, in the second column induced cells in adipogenic medium before cryopreservation and in the third column induced cells after cryopreservation. After 14 days cells were fixed and stained with Oil Red O. Red colorization presents lipid droplets of adipogenically differentiated cells. All induced cells undergo adipogenic differentiation. Photographs were made with inverted microscope Nikon, scale bar represents 100 μm .

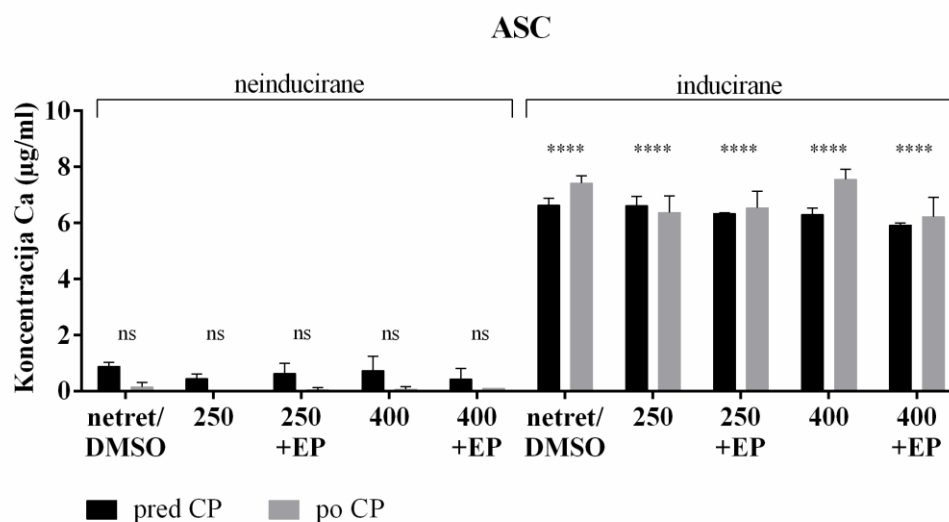


Slika 14: Adipogena diferenciacija celic UC-MSC pred in po krioprezervaciji. Kontrolne netretirane celice oz. zamrznjene z DMSO (A–C), neelektroporirane v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 0 kV/cm) (D–F), elektroporirane celice v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 mM TH + 1,5 kV/cm) (G–I). Neinducirane celice so prikazane na slikah v prvem stolpcu, inducirane v adipogenem mediju pred krioprezervacijo v drugem in inducirane celice po krioprezervaciji v tretjem stolpcu. Celice so bile nasajene v gojilno posodo v kontrolno

ali adipogeno gojišče. Po 14-ih dneh smo celice fiksirali ter barvali z Oil Red O. Rdeče so se obarvale maščobne kapljice pri adipogeno diferenciranih celicah. Na sliki vidimo, da so se vse inducirane celice tretirane v različnih razmerah adipogeno diferencirale. Slike so bile posnete s kamero pod invertnim mikroskopom Nikon, merilce predstavlja 100 μm .

Figure 14: Adipogenic differentiation of UC-MSC before and after cryopreservation. Control non-treated cells or cryopreserved with DMSO (A–C), non-electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose (250 mM TH + 0 kV/cm) (D–F), electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose (250 mM TH + 1.5 kV/cm) (G–I). Cells were seeded into culture wells for adipogenic differentiation. In the first column are non-induced cells, in the second column induced cells in adipogenic medium before cryopreservation and in the third column induced cells after cryopreservation. After 14 days cells were fixed and stained with Oil Red O. Red colorization presents lipid droplets of adipogenically differentiated cells. All induced cells undergo adipogenic differentiation. Photographs were made with inverted microscope Nikon, scale bar represents 100 μm .

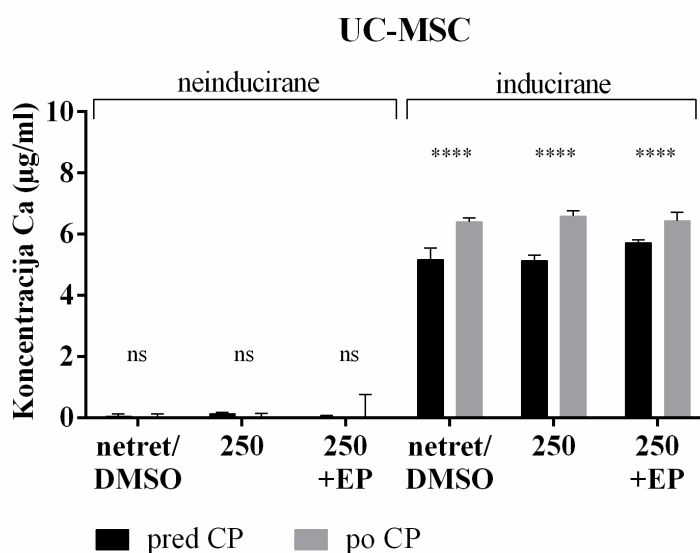
Na sliki 15 so prikazani rezultati ASC osteogene diferenciacije pred in po krioprezervaciji. V prvem delu (levo) so prikazani rezultati nediferenciranih celic, gojenih v neinduciranem – kontrolnem mediju. V drugem delu (desno) so rezultati celic gojenih v osteogenem mediju, kjer so se celice diferencirale. Pri vseh induciranih parametrih smo izmerili visoke koncentracije celokupnega kalcija. Med netretiranimi oz. zamrznjenimi celicami z DMSO (netret/DMSO) in tretiranimi (250, 250 + EP, 400 oz. 400 + EP) ni statistično značilne razlike, tako pri neinduciranih kot pri induciranih celicah. To pomeni, da so celice v različnih razmerah ohranile funkcionalne sposobnosti, in so se bile sposobne po osteogeni indukciji diferencirati v osteogeno linijo. Enake rezultate smo pridobili tudi pred in po krioprezervaciji. Podobne rezultate smo dobili tudi pri celicah UC-MSC (Slika 16) le da tu nismo testirali celic v prisotnosti 400 mM trehaloze.



Slika 15: Osteogena diferenciacija ASC pred in po krioprezervaciji (CP). Celice so bile tretirane z elektroporacijo pri 1,5 kV/cm v prisotnosti 250 in 400 mM trehaloze (250 + EP oz. 400 + EP) in brez elektroporacije v prisotnosti 250 in 400 mM trehaloze (250 oz. 400). Kontrolni vzorec so bile netretirane celice oz. zamrznjene z DMSO (netret/DMSO). Neinducirane celice (gojene v kontrolnem mediju) in inducirane

celice (gojene v osteogenem mediju) smo testirali po 4 tednih gojenja z merjenjem koncentracije celokupnega kalcija. Prikazani rezultati so srednja vrednost s standardno napako treh tehničnih ponovitev. Vse p vrednosti so primerjane na neinducirane netretirane celice pred zamrzovanjem. ns – nesignifikantne razlike; **** $p < 0,0001$ (enofaktorska analiza variance ANOVA).

Figure 15: Osteogenic differentiation of ASC before and after cryopreservation (CP). Cells were treated with electroporation at 1.5 kV/cm using 250 or 400 mM trehalose (250 + EP or 400 + EP) and without electroporation in the presence of 250 or 400 mM trehalose (250 oz. 400). Control sample were non-treated cells or cryopreserved using DMSO (netret/DMSO). Non-induced cells (in non-osteogenic medium) and induced cells (in osteogenic medium) were sampled after 4 weeks and total calcium concentration was measured. Mean values with SE of 3 technical repetitions are presented. All P values are compared to non-induced non-treated cells before cryopreservation. ns signifies not significant; **** $p < 0.0001$ (one-way parametric ANOVA test).



Slika 16: Osteogena diferenciacija UC-MSc pred in po krioprezervaciji (CP). Celice so bile tretirane z elektroporacijo pri 1,5 kV/cm v prisotnosti 250 mM trehaloze (250 + EP) in brez elektroporacije v prisotnosti 250 mM trehaloze (250). Kontrolni vzorec so bile netretirane celice oz. zamrznjene z DMSO (netret/DMSO). Neinducirane celice (gojene v kontrolnem mediju) in inducirane celice (gojene v osteogenem mediju) smo testirali po 4 tednih gojenja z merjenjem koncentracije celokupnega kalcija. Prikazani rezultati so srednja vrednost s standardno napako treh tehničnih ponovitev. Vse p vrednosti so primerjane na neinducirane netretirane celice pred zamrzovanjem. ns – nesignifikantne razlike, **** $p < 0,0001$ (enofaktorska analiza variance ANOVA).

Figure 16: Osteogenic differentiation of UC-MSc before and after cryopreservation (CP). Cells were treated with electroporation at 1.5 kV/cm using 250 mM trehalose (250 + EP) and without electroporation in the presence of 250 mM trehalose (250). Control sample were non-treated cells or cryopreserved using DMSO (netret/DMSO). Non-induced cells (in non-osteogenic medium) and induced cells (in osteogenic medium) were sampled after 4 weeks and total calcium concentration was measured. Mean values with SE of 3 technical repetitions are presented. All P values are compared to non-induced non-treated cells before cryopreservation. ns signifies not significant; **** $p < 0.0001$ (one-way parametric ANOVA test).

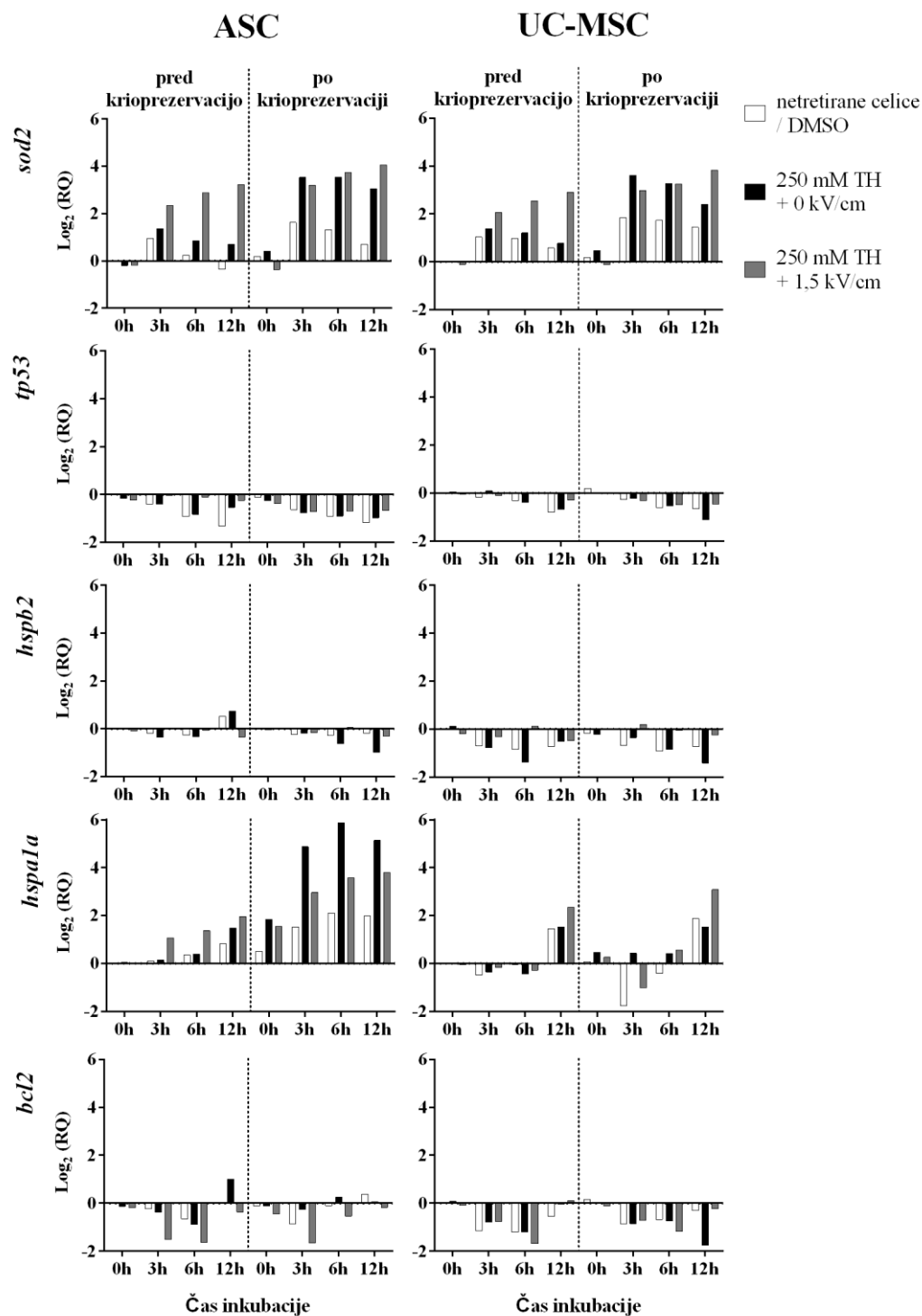
4.5 ANALIZA IZRAŽANJA STRESNIH GENOV

Vpliv elektroporacije in zamrzovanja na celice ASC in UC-MSK smo preverjali z izražanjem različnih stresnih genov: superoksid dismutaze (*sod2*), tumorskega proteina p53 (*tp53*), B-celičnega limfoma 2 (*bcl2*) in dveh genov iz družine stresnih proteinov (angl. »heat shock«), *hspb2* in *hspal1a*. Izražanje smo opazovali v različnih časovnih intervalih in sicer po 0 h, 3 h, 6 h in 12 h. Izražanje genov smo normalizirali na kontrolni – netretiran vzorec v času 0 h.

Pri obeh celičnih tipih ASC in UC-MSK (Slika 17), je bilo izražanje genov *tp53*, *hspb2* in *bcl2* biološko nepomembno. Razlike med tretiranimi in netretiranimi vzorci smo upoštevali kot biološko pomembne, če je bila sprememba večja za vsaj 4-krat (kar ustreza 2-kratnemu povečanju na logaritemski skali).

Izražanje gena *sod2* je pred zamrzovanjem naraslo le pri elektroporiranih vzorcih celic ASC (5-krat po treh urah, 7-krat po šestih urah in 9-krat po dvanajstih urah). Po odmrzovanju pa je izražanje *sod2* še bistveno naraslo tako pri elektroporiranih, kot pri neelektroporiranih vzorcih. Po 12 urah je bilo izražanje gena *sod2* pri elektroporiranih vzorcih 17-krat višje kot v kontrolnem vzorcu, medtem ko je bilo izražanje pri neelektroporiranih 8-krat višje. V povprečju je bilo izražanje gena *sod2* bistveno višje po odmrzovanju celic pri vseh parametrih. Podoben trend smo opazili tudi pri celicah UC-MSK. Izražanje *sod2* je naraslo pri elektroporiranih celicah pred zamrzovanjem za 4-krat po 3 urah, 6-krat po 6 urah, in 7-krat po 12 urah. Pri neelektroporiranih celicah bistvenega povišanja v izražanju nismo zaznali. Po odmrzovanju je izražanje *sod2* naraslo tako pri elektroporiranih kot neelektroporiranih celicah. Po 12 urah je izražanje naraslo za 14-krat pri elektroporiranih in 5-krat pri neelektroporiranih celicah. Pri obeh celičnih tipih je izražanje *sod2* pri elektroporiranih celicah s časom naraščalo, medtem ko je pri neelektroporiranih upadalo. Izražanje *sod2* pri celicah tretiranih z DMSO je sicer s časom upadalo, z višjimi vrednostmi po krioprezervaciji, vendar so bile te razlike biološko nepomembne.

Izražanje gena stresnega proteina *hspal1a* je malenkost naraslo pri elektroporiranih celicah ASC pred zamrzovanjem šele po 12 urah. Medtem je izražanje *hspal1a* pri vseh odmrznjenih vzorcih naraslo že po 3 urah. Zanimivo je, da je izražanje gena *hspal1a* bistveno večje pri neelektroporiranih celicah (4-krat pri 0 urah, 29-krat pri 3 urah, 58-krat pri 6 urah in 35-krat pri 12 urah) v primerjavi z elektroporiranimi (3-krat pri 0 urah, 8-krat pri 3 urah, 12-krat pri 6 urah in 14-krat pri 12 urah). Pri celicah UC-MSK smo opazili rahlo povišanje izražanja *hspal1a* šele po 12 urah pred in po odmrzovanju celic, kjer je bilo najvišje pri elektroporiranih celicah v primerjavi z neelektroporiranimi in kontrolo.



Slika 17: Izražanje stresnih genov pri ASC in UC-MSC. Pred in po odmrzovanju celic v različnih časovnih točkah (0 h, 3 h, 6 h in 12 h), brez elektroporacije (250 mM TH + 0 kV/cm) in z elektroporacijo (250 mM TH + 1,5 kV/cm) ter celicah zamrznjenih z DMSO. Primerjali smo izražanje genov *sod2*, *tp53*, *hspb2*, *hspal1a* in *bcl2*. Biološko pomembne razlike smo opazili le pri izražanju genov *sod2* in *hspal1a* in sicer pri obeh celičnih tipih. Rezultati so normalizirani na netretiran (brez elektroporacije in brez krioprezervacije) kontrolni vzorec

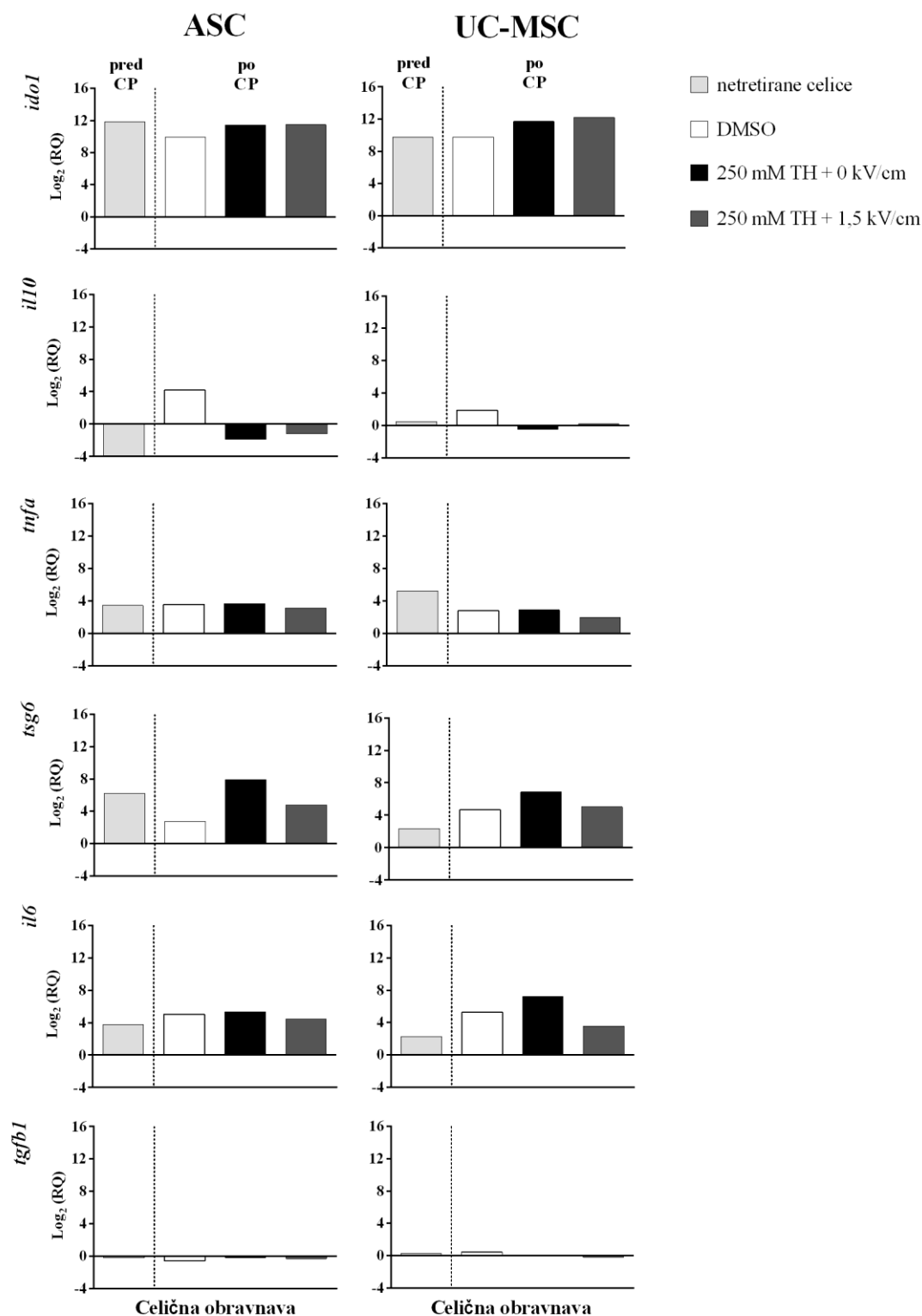
v času $t = 0$ h. Razlike med tretiranimi in netretiranimi vzorci smo upoštevali kot biološko pomembne, če je bila sprememba večja za vsaj 4-krat, kar ustreza 2-kratnemu povečanju na logaritemski lestvici.

Figure 17: Stress related gene expression of ASC and UC-MSC. Before and after cryopreservation at different time points (0 h, 3 h, 6 h and 12 h) without (250 mM TH + 0 kV/cm) and with (250 mM TH + 1.5 kV/cm) electroporation or cryopreserved with DMSO. Comparison of *sod2*, *tp53*, *hspb2*, *hspal1* and *bcl2* genes are presented. Biological significant changes were observed only for *sod2* and *hspal1* gene expression. The expression values are normalized to non-treated (no cryopreservation, no electroporation) cells at $t = 0$ h. The difference between treated and non-treated samples was considered as biologically relevant, when the calculated fold change ≥ 4 , which equals Log₂ fold change ≥ 2 in logarithmic scale.

4.6 IZRAŽANJE GENOV Z AKTIVACIJO VNETNIH FAKTORJEV

Da bi poiskali odgovor na vprašanje ali elektroporacija in krioprezervacija vplivata na imunomodulacijske odzive celic ASC in UC-MSC, smo celice aktivirali z vnetnima faktorjema IFN γ in TNF α . Preverjali smo izražanje različnih genov, vpletenih v imunski odziv: *ido1*, *il10*, *tnfa*, *tsg6*, *il6* in *tgfb1* in sicer pri netretiranih vzorcih, vzorcih krioprezerviranih z DMSO, 250 mM trehalozo brez elektroporacije in z 250 mM trehalozo in elektroporacijo.

Izražanje glavnega imunomodulacijskega gena *ido1* (Slika 18) je bilo pri celicah ASC nekoliko znižano pri krioprezerviranih vzorcih v primerjavi s kontrolo. Ko pa krioprezervirane vzorce s trehalozo primerjamo z DMSO, opazimo višje izražanje pri neelektroporiranih za 2,7-krat in 3-krat v primerjavi z elektroporiranimi vzorci. Pri celicah UC-MSC smo najvišje izražanje *ido1* opazili pri vzorcu zamrznjenem s trehalozo in elektroporacijo in nekoliko nižje pri neelektroporiranem vzorcu. V primerjavi z DMSO smo opazili 4-kratno povišanje pri celicah zamrznjenih samo s trehalozo ter 5,6-krat višje v kombinaciji z elektroporacijo. Pri celicah ASC je izražanje *il10* nizko pri vseh vzorcih razen pri vzorcih zamrznjenih z DMSO (18-kratno povišanje po aktivaciji). Podoben odziv smo dobili pri celicah UC-MSC, izražanje *il10* je naraslo za približno 4-krat le pri trežiranju z DMSO. Izražanje *tnfa* pri celicah ASC je bilo skoraj enako pri vseh vzorcih, medtem ko je bilo pri celicah UC-MSC, izražanje *tnfa* najvišje pri kontrolnem vzorcu, ki ni bil zamrznjen. Tudi ekspresija *tsg6* je bila zvišana pri celicah zamrznjenih z DMSO in sicer pri obeh tipih celic. Pri celicah ASC je bilo izražanje 37-krat višje pri celicah zamrznjenih s trehalozo in 4,5-krat višje pri celicah zamrznjenih s trehalozo in elektroporacijo. Podobno smo opazili pri celicah UC-MSC, le da je bilo povišanje 4,5-kratno pri neelektroporiranih vzorcih in 1,3-kratno pri elektroporiranih v primerjavi z DMSO. *il6* je bil zvišan pri vseh krioprezerviranih vzorcih v primerjavi s kontrolo. V primerjavi z DMSO je bil manj izražen pri elektroporiranem vzorcu s trehalozo, pri celicah ASC za 1,6-krat in pri celicah UC-MSC za 3,25-krat. Pri obeh celičnih tipih spremembe izražanja *tgfb1* aktiviranih celic niso bile biološko significantne.



Slika 18: Izražanje imunomodulacijskih genov pri celicah ASC in UC-MSC. Pred (netretirane celice, neelektroporirane in nekrioprezervirane) in po krioprezervaciji (CP) z DMSO, 250 mM trehalozo brez (250 mM TH + 0 kV/cm) ali z elektroporacijo (250 mM TH + 1,5 kV/cm). Celice smo aktivirali z IFN γ + TNF α .

Vrednosti izražanja smo normalizirali na ne-aktivirane vzorce. Razlike med tretiranimi in netretiranimi vzorci smo upoštevali kot biološko pomembne, če je bila sprememba večja za vsaj 4-krat, kar ustreza 2-kratnemu povečanju na logaritemski skali.

Figure 18: Immunomodulatory gene expression of ASC and UC-MSC. Before (non-treated cells – no cryopreservation, no electroporation) and after cryopreservation (CP) using DMSO or 250 mM trehalose without (250 mM TH + 0 kV/cm) or with electroporation (250 mM TH + 1.5 kV/cm). Cells were activated by IFN γ + TNF α . The expression values are normalized to non-activated counterparts. The difference between treated and non-treated sample was considered as biologically relevant when the calculated fold change ≥ 4 , which equals Log₂ fold change ≥ 2 in logarithmic scale.

4.7 ZAMRZOVANJE TKIVA POPKOVNICE Z ELEKTROPORACIJO IN TREHALOZO

Po optimizaciji parametrov na celični kulturi smo želeli preveriti ali lahko v enakih razmerah zamrzujemo tudi tkivo popkovnice. Tkivo popkovnice smo pred zamrzovanjem tretirali na različne načine. Viabilnost tkiva smo preverjali pred in po odmrzovanju. Najprej smo testirali tkivo pred zamrzovanjem in preverjali ali različne razmere vplivajo na rast celic iz tkiva. Iz Preglednice 1, kjer smo pri prvem vzorcu (D1) za elektroporacijo uporabili jakost električnega polja 2 kV/cm, je razvidno, da smo pri svežih neelektroporiranih tkivih ter kontroli zaznali celično rast pri vseh analiziranih koščkih. Celična rast iz eksplantov med gojenjem je bila zaznana v 7/10 koščkih tkiva. Ob koncu gojenja, ko smo celice/tkivo pobarvali s testom MTT za ugotavljanje celične viabilnosti ali metabolne aktivnosti celic, smo pri treh koščkih zaznali tudi rast celic na površini tkiva. Na tkivu so se tvorili vijolični kristalčki formazana, kar dokazuje prisotnost viabilnih ali metabolno aktivnih celic. Pri tkivih, kjer sicer nismo zaznali celične rasti na površini gojilne posode, smo po barvanju z MTT in opazovanjem tkiva pod lupo opazili rast celic na površini tkiva. Pri kontrolnih vzorcih smo pri vseh koščkih tkiva zaznali celično rast ali celično viabilnost (10/10). Enak rezultat smo dobili pri tkivih, ki so bila inkubirana le v prisotnosti trehaloze. Pri elektroporiranih vzorcih pri jakosti električnega polja 2 kV/cm pa nismo v nobenem tkivu zaznali celične rasti, tudi po barvanju z MTT-jem ne.

Po odmrzovanju tkiva smo zaznali rast celic le pri kontrolnem vzorcu, zamrznjenim z 10 % DMSO. Adherentno rast celic smo opazili v dveh primerih, po barvanju z MTT pa še v dodatnih treh na samem tkivu. Pri vseh ostalih vzorcih, elektroporiranih (2 kV/cm) ali neelektroporiranih v prisotnosti 250 mM trehaloze pa celične rasti nismo opazili, niti ne po barvanju z MTT-jem ne.

Preglednica 1: Prisotnost rasti celic pri vzorcu tkiva D1: E = 2 kV/cm. Prisotnost rasti celic iz tkiva smo preverjali pri svežem in odmrznjenem tkivu. Tkivo je bilo pred analizo oz. zamrzovanjem tretirano na različne načine: kontrola - netretirano tkivo (oz. zamrznjeno z DMSO), tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi (i30' + 250 TH), tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi in nato elektroporirano pri 2 kV/cm (i30' + 250 TH + 2 EP), tkivo elektroporirano pri 2 kV/cm v 250 mM trehalozi in nato 30 minut inkubirano (2 EP + 250 TH + i30').

Table 1: Explant growth from tissue D1: E = 2 kV/cm. Cell growth of explant was examined before and after tissue cryopreservation. Before analysis tissue was treated as: control - untreated tissue (or frozen with DMSO), tissue incubated for 30 minutes in 250 mM trehalose (i30' + 250 TH), tissue incubated for 30 minutes in 250 mM trehalose then electroporated at 2 kV / cm (i30' + 250 TH + 2 EP), tissue electroporated at 2 kV / cm in 250 mM trehalose then incubated for 30 minutes (2 EP + 250 TH + i30').

vzorec D1: E = 2 kV/cm	SVEŽE TKIVO			ODMRZNJENO TKIVO		
	Prisotna adherentna rast celic	Metabolno aktivne celice na tkivu	Ni rasti	Prisotna adherentna rast celic	Metabolno aktivne celice na tkivu	Ni rasti
Kontrola / DMSO	7/10	3/10	0/10	2/10	3/10	5/10
i30' + 250 TH	7/10	3/10	0/10	0/10	0/10	10/10
i30' + 250 TH + 2 EP	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	10/10
2 EP + 250 TH + i30'	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	10/10

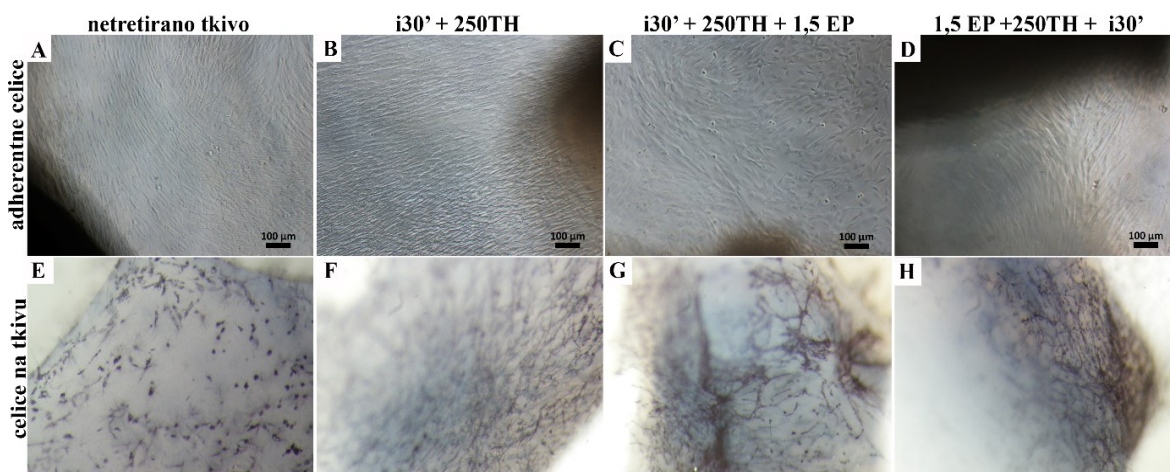
Pri drugem biološkem vzorcu (D2) (Preglednica 2), kjer smo za elektroporacijo uporabili nižjo jakost električnega polja – 1,5 kV/cm, smo pri svežem kontrolnem in neelektroporiranem vzorcu dobili podoben rezultat, kot pri prvem biološkem vzorcu. Pri kontroli smo zaznali celično rast v 7/10 koščkih, po barvanju z MTT pa še v dodatnih dveh. Le pri enem koščku nismo zaznali metabolne aktivnosti celic. Enak rezultat smo dobili pri neelektroporiranih celicah. Pri elektroporiranih vzorcih, kjer smo tkivo najprej izpostavili inkubaciji in po 30 min tkivo elektroporirali pri 1,5 kV/cm, so celice rasle pri 3/10 tkivih in dodatnih treh po barvanju z MTT. Podoben rezultat smo opazili tudi pri tkivih, ki so bila najprej elektroporirana in nato inkubirana 30 min (rast celic v 4/10 ter dodatne 3 po barvanju z MTT). Na sliki 19 so prikazani eksplanti tkiva. V vseh razmerah smo pridobili adherentne celice. Tudi po barvanju z MTT smo opazili na tkivu vijolične kristale, kar pomeni, da smo pridobili metabolno aktivne celice na tkivu.

Po odmrzovanju tkiva pa smo dobili podoben rezultat kot pri prvem biološkem vzorcu. Celično rast smo zaznali le pri kontrolnem vzorcu zamrznjenem z 10 % DMSO 5/10, ter dodatne 2 na tkivu, po barvanju z MTT. Pri elektroporiranih in neelektroporiranih vzorcih tkiva nismo opazili celične rasti, tudi po barvanju z MTT ne. Na sliki 20 so prikazani eksplanti tkiva. Adherentno rast celic smo opazili le pri tkivu zamrznjenem z DMSO. Tudi po barvanju z MTT smo opazili vijolične kristale le na tkivu zamrznjenem z DMSO, kar pomeni, da smo pridobili metabolno aktivne celice le na tkivu zamrznjenem z DMSO.

Preglednica 2: Prisotnost rasti celic pri vzorcu tkiva D2: E = 1,5 kV/cm. Prisotnost rasti celic iz tkiva smo preverjali pri svežem in odmrznjenem tkivu. Tkivo je bilo pred analizo oz. zamrzovanjem tretirano na različne načine: kontrola - netretirano tkivo (oz. zamrznjeno z DMSO), tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi (i30' + 250 TH), tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi in nato elektroporirano pri 1,5 kV/cm (i30' + 250 TH + 1,5 EP), tkivo elektroporirano pri 1,5 kV/cm v 250 mM trehalozi in nato 30 minut inkubirano v trehalozi (1,5 EP + 250 TH + i30').

Table 2: Explant growth from tissue D1: E = 1,5 kV/cm. Cell growth of explant was examined before and after tissue cryopreservation. Before analysis tissue was treated as: control - untreated tissue (or frozen with DMSO), tissue incubated for 30 minutes in 250 mM trehalose (i30' + 250 TH), tissue incubated for 30 minutes in 250 mM trehalose then electroporated at 1,5 kV/cm (i30' + 250 TH + 1,5 EP), tissue electroporated at 1,5 kV/cm in 250 mM trehalose then incubated for 30 minutes in trehalose (1,5 EP + 250 TH + i30').

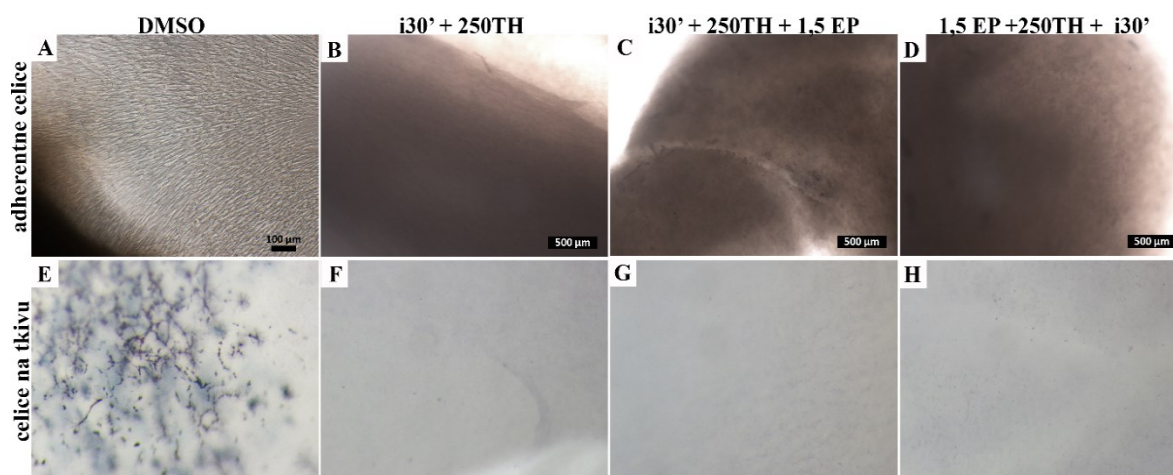
vzorec D2: E = 1,5 kV/cm	SVEŽE TKIVO			ODMRZNJENO TKIVO		
	Prisotna adherentna rast celic	Metabolno aktivne celice na tkivu	Ni rasti	Prisotna adherentna rast celic	Metabolno aktivne celice na tkivu	Ni rasti
Kontrola / DMSO	7/10	2/10	1/10	5/10	2/10	3/10
i30' + 250 TH	7/10	2/10	1/10	0/10	0/10	10/10
i30' + 250 TH + 1,5 EP	3/10	3/10	4/10	0/10	0/10	10/10
1,5 EP + 250 TH + i30'	4/10	3/10	3/10	0/10	0/10	10/10



Slika 19: Eksplanti tkiva pred krioprezervacijo. Tkivo je bilo pred zamrzovanjem tretirano na različne načine: kontrola - netretirano tkivo (A, E), tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi (i30' + 250 TH) (B, F), tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi nato elektroporirano pri 1,5 kV/cm (i30' + 250 TH + 1,5 EP) (C, G), tkivo elektroporirano pri 1,5 kV/cm v 250 mM trehalozi nato 30 minut inkubirano (1,5 EP + 250 TH + i30') (D, H). V zgornji vrstici (A-D) so prikazane adherentne celice, ki so izraščale iz tkiva (eksplanti). V vseh razmerah smo pridobili adherentne celice. Slike so bile posnete s kamero pod invertnim mikroskopom, merilce predstavlja 100 µm. V spodnji vrstici (E-H) so prikazane metabolno aktivne celice na tkivu po barvanju z MTT, ki se obarvajo vijolično. V vseh razmerah smo pridobili metabolno aktivne celice. Slike so bile posnete s fotoaparatom pod lupo Nikon, pri 16x povečavi.

Figure 19: Tissue explants before cryopreservation. Before cryopreservation tissue was treated: control - untreated tissue (A, E), tissue incubated for 30 minutes in 250 mM trehalose (i30' + 250 TH) (B, F), tissue incubated for 30 minutes in 250 mM trehalose then electroporated at 1.5 kV/cm (i30' + 250 TH + 1.5 EP) (C, G), tissue electroporated at 1.5 kV/cm in 250 mM trehalose then incubated for 30 minutes (1.5 EP + 250 TH + i30')

i30') (D, H). The top line (A-D) shows the adherent cells of tissue explant. Adherent cells were obtained under all conditions. The images were taken with a camera under an inverted microscope, scale bar represents 100 μm . The bottom line (E-H) presents the metabolically active cells on tissues after MTT staining resulting in violet crystals. Metabolically active cells were obtained under all conditions. Images were taken with camera under microscope Nikon, at 16x magnification.



Slika 20: Eksplanti tkiva po krioprezervaciji. Tkivo je bilo pred zamrzovanjem tretirano na različne načine, nato zamrznjeno: kontrola - DMSO (A, E), tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi (i30' + 250 TH) (B, F), tkivo 30 minut inkubirano v 250 mM trehalozi nato elektroporirano pri 1,5 kV/cm (i30' + 250 TH + 1,5 EP) (C, G), tkivo elektroporirano pri 1,5 kV/cm v 250 mM trehalozi nato 30 minut inkubirano (1,5 EP + 250 TH + i30') (D, H). V zgornji vrstici (A-D) so prikazane adherentne celice, ki so izraščale iz tkiva (eksplanti). Adherentne celice smo pridobili le pri tkivu zamrznjenem z DMSO (slika A), pri drugih nismo opazili celic (slike B-D). Slike so bile posnete s kamero pod invertnim mikroskopom, merilce predstavlja 100 μm (slika A) oz. 500 μm (slike B-D). V spodnji vrstici (E-H) so prikazane metabolo aktivne celice na tkivu po barvanju z MTT, ki se obarvajo vijolično. Metabolo aktivne celice smo pridobili le pri tkivu zamrznjenem z DMSO (slika E), pri drugih nismo opazili metabolo aktivnih celic (slike F-H). Slike so bile posnete s fotoaparatom pod lupo pri 16x povečavi.

Figure 20: Tissue explants after cryopreservation. Before cryopreservation tissue was treated and after cryopreserved: control – cryopreseved with DMSO (A, E), tissue incubated for 30 minutes in 250 mM trehalose (i30' + 250 TH) (B, F), tissue incubated for 30 minutes in 250 mM trehalose then electroporated at 1.5 kV/cm (i30' + 250 TH + 1.5 EP) (C, G), tissue electroporated at 1.5 kV/cm in 250 mM trehalose then incubated for 30 minutes (1.5 EP + 250 TH + i30') (D, H). The top line (A-D) shows the adherent cells of tissue explant. Adherent cells were obtained only after DMSO cryopreservation. The images were taken with a camera under an inverted microscope, scale bar represents 100 μm (figure A) or 500 μm (figure B-D), respectively. The bottom line (E-H) presents the metabolically active cells on tissues after MTT staining resulting in violet crystals. Metabolically active cells were obtained only after DMSO cryopreservation. Images were taken with camera under microscope Nikon at 16x magnification.

5 RAZPRAVA

Krioprezervacija je eden glavnih postopkov pri pripravi kvalitetnih celičnih produktov za zdravljenje pacientov. Največkrat uporabljen krioprotektant je 10 % DMSO, ki pa je toksičen in lahko privede do neželenih stranskih učinkov zdravljenja. V naši raziskavi smo želeli pripraviti in optimizirati postopek zamrzovanja, kjer bi se izognili uporabi toksičnega DMSO-ja. Zato smo uporabili netoksični sladkor trehalozo, ki smo jo v celice vnesli z elektroporacijo, da povečamo možnosti preživetja celic po krioprezervaciji, saj velja, da trehaloza celične membrane ne more prehajati.

5.1 PERMEABILIZACIJA CELIČNE MEMBRANE Z ELEKTROPORACIJO

V prvem sklopu poskusov smo določili ustrezno amplitudo pulzov za uspešno celično permeabilizacijo in viabilnost celic ASC in UC-MSK. Za dovajanje pulza celicam smo izbrali že prej večkrat uporabljene parametre: čas trajanja pulza 100 μ s, frekvenca pulzov 1 Hz in število pulzov 8 (Dermol-Černe in sod., 2018; Potočnik in sod., 2019; Pavlin in sod., 2007; Kandušer in sod., 2008). Z višanjem jakosti električnega pulza smo ugotovili, da se odstotek permeabilizacije dviguje, medtem ko viabilnost celic upada (Slika 6). Pri okrog 2 kV/cm permeabilizacija doseže plato, kar pomeni, da z višanjem jakosti električnega pulza ne vnesemo bistveno več PI v celico, le viabilnost močno upade. Optimalno amplitudo pulza smo pri celicah ASC določili pri 1,5 kV/cm (oz. napetosti 300 V), kjer sta se krivulji permeabilizacije in viabilnosti sekali; dobili smo hkrati dovolj permeabiliziranih in dovolj viabilnih celic. Pri celicah UC-MSK bi bila optimalna točka pri nekoliko višji amplitudi (okrog 2 kV/cm), vendar smo želeli obdržati enake parametre za oba celična tipa in pri tem ohraniti čim višjo viabilnost celic, zato smo izbrali skupno optimalno amplitudo pulza pri 1,5 kV/cm. Za vse nadaljnje poskuse smo uporabili parametre pulza: čas trajanja pulza 100 μ s, frekvenca pulzov 1 Hz, število pulzov 8 ter amplitudo pulza 1,5 kV/cm. Dokazali smo, da lahko z elektroporacijo v celice ASC in UC-MSK vnesemo PI, poleg tega pa celic ne poškodujemo v preveliki meri, saj ohranijo dovolj visoko viabilnost. Kljub temu, da imata trehaloza in PI različno strukturo in naboj, imata precej majhno molekulsko maso v primerjavi z drugimi fluorescentnimi barvili, ki pri trehalozi znaša 342,3 g/mol, pri PI pa 668.4 g/mol (Mohr in sod., 2006), zato smo predpostavili podobno prehajanje trehaloze preko celične membrane.

5.2 CELIČNA VIABILNOST PRED IN PO KRIOPREZERVACIJI CELIC

Veliko raziskovalnih skupin je že poskušalo vnesti trehalozo v sesalske celice na najrazličnejše načine: od izkoriščanja puščanja membrane med termotropnim prehodom lipidne faze, mikroiniciranja, genskih konstrukтов, vektorskih transfekcij, do vnosa z nanodelci. Z nobeno metodo ni bila dosežena dovolj visoka učinkovitost vnosa ali pa so bili postopki precej zahtevni za izvedbo (Beattie in sod., 1997; Wolkers in sod., 2001; Eroglu in

sod., 2000; Guo in sod., 2000; Rao in sod., 2015). Elegantnejši način vnosa molekul v celico lahko dosežemo z elektroporacijo. Tako je Shirakashi s sod., (2002) pokazal, da se z reverzibilno elektroporacijo lahko vnese trehalozo v mišjo celično linijo. Glede na eksperimentalne podatke o spremembi volumna celice so s pomočjo modeliranja izračunali, da je v celico prešlo najverjetneje okrog 100 mM trehaloze pri uporabi 290 mM zunajcelične koncentracije, pri čemer so uporabili en pulz pri jakost električnega pulza 2 kV/cm in trajanju 20 μ s. Na človeških celicah so Zhou in sod., (2010) uporabili kombinacijo elektroporacije in trehaloze za zamrzovanje z liofilizacijo na eritrocitih. Najvišje preživetje po rehidraciji, 70,9 %, so dobili z uporabo 800 mM zunajcelične trehaloze, s čimer so v celicah izmerili 63,7 mM trehaloze. Pri elektroporaciji so uporabili enako jakost električnega polja kot v naših poskusih, 1,5 kV/cm, vendar le 4 pulze na minuto z dolžino 1 ms. Drugje nismo zasledili uporabe elektroporacije v kombinaciji s trehalozo za krioprezervacijo humanih celic. Zato smo l. 2015 objavili kratek povzetek zamrzovanja človeških celicah UC-MSK (Dovgan in sod., 2015) ter l. 2017 objavili študijo krioprezervacije človeških celic ASC v kombinaciji elektroporacije s trehalozo (Dovgan in sod., 2017). Kasneje smo v sodelovanju objavili članek krioprezervacije človeških celic UC-MSK s kombinacijo elektroporacije in različnih sladkorjev, trehaloze, saharoze in rafinoze (Mutsenko in sod., 2019).

Po določitvi ustrezne amplitude pulzov za elektroporacijo smo celice zamrzili v prisotnosti različnih koncentracij trehaloze ter preverjali njihovo viabilnost. V prvem delu smo celice ASC zamrzovali pri dveh koncentracijah trehaloze (250 mM in 400 mM) z ali brez elektroporacije. Pri koncentraciji 250 mM trehaloze ohranimo izotonično raztopino, da se izognemo vplivu osmotskega šoka na celice. Poleg tega v izotonični raztopini ne pride do nabrekanja celice (povečanja volumna celice), ki lahko povzroči lizo celice (Kotnik in sod. 2019). Za hipeosmotsko raztopino smo za povečano difuzijo trehaloze v celico uporabili koncentracijo 400 mM trehaloze. Ugotovili smo, da elektroporacija in trehaloza pred zamrzovanjem nimata negativnega vpliva na celično viabilnost (Slika 7). Po odmrzovanju pa je bila celična viabilnost pri celicah zamrznjenih brez elektroporacije nižja (64 %) kot pa pri celicah zamrznjenih po standardnem protokolu v 10 % DMSO (92 %). Ko pa smo celice predhodno elektroporirali, smo dosegli višje viabilnosti po odmrzovanju (84 % pri 250 mM trehalozi in 78 % pri 400 mM trehalozi), ki so primerljive z zamrzovanjem z DMSO. Pri zamrzovanju z višjo koncentracijo trehaloze, 400 mM, nismo dosegli boljše viabilnosti. Kljub temu pa smo kasneje v študiji, ki smo jo opravili v sodelovanju s kolegi iz Nemčije, opazili, da z višjo koncentracijo trehaloze, v tem primeru 400 mM, pridobimo višje preživetje celic UC-MSK po odmrzovanju (Mutsenko in sod., 2019).

V literaturi najdemo podatke o zelo različnih koncentracijah zunajcelične trehaloze, v rangu med 200 in 800 mM, ki pripomorejo k bolj ali manj uspešni krioprezervaciji celic, vendar pa so pri tem postopki vnosa trehaloze v celice zelo različni (Campel in sod., 2012; Zhou in sod., 2010; Shirakashi in sod., 2002; Eroglu in sod., 2000; Eroglu in sod., 2008; Wolkers in sod., 2001). Poleg že omenjenih poskusov vnosa trehaloze z elektroporacijo so Eroglu in sod. (2000) ter Buchanan in sod. (2004) za vnos trehaloze preko por, tvorjenih z α -

hemolizinom, uporabili inkubacijo v 200 mM trehalozi. Po krioprezervaciji je Eroglu pri dveh različnih celičnih tipih dosegel 80 oz. 70 % viabilnost, Buchanan pa primerljivo tvorjenje kolonij (CFU – angl. »colony forming units«) s celicami, zamrznjenimi z DMSO. Večina raziskovalnih skupin je dobila najboljše preživetje po krioprezervaciji ob inkubiranju pri izoosmotski koncentraciji trehaloze ali nekoliko višje. Ker smo v naši študiji pri poskusih s celicami ASC opazili, da z višanjem koncentracije trehaloze ne pridobimo višjega preživetja po odmrzovanju celic, smo zato v drugem delu poskusov želeli znižati zunajcelično koncentracijo trehaloze ter s tem ugotoviti, kakšna je še dovolj visoka najnižja zunajcelična koncentracija trehaloze za uspešno krioprezervacijo.

Iz rezultatov celične viabilnosti (Slika 8 in 9) pred in po zamrzovanju s koncentracijami zunajcelične trehaloze od 0 do 250 mM pri celicah ASC in UC-MSK smo ugotovili, da pred zamrzovanjem nižja koncentracija trehaloze nima vpliva na celično viabilnost. Po odmrzovanju pa smo ugotovili, da se z višanjem zunajcelične koncentracije trehaloze povečuje tudi celična viabilnost. Najvišje preživetje smo ugotovili pri 250 mM koncentraciji trehaloze, kot smo jo uporabili že v prvih poskusih, pri testiranju permeabilizacije in viabilnosti celic. Pri celicah ASC je celično preživetje po odmrzovanju približno 72 %, pri celicah UC-MSK pa 83 %, kar je primerljivo s kontrolnim protokolom zamrzovanja z 10 % DMSO (75 % pri ASC in 81 % pri UC-MSK). Zanimive rezultate smo dobili pri zamrzovanju celic samo v trehalozi brez uporabe elektroporacije, saj smo dobili le 10 % nižjo viabilnost, kar sicer ni statistično različno v primerjavi s celicami zamrznjenimi s trehalozo in elektroporacijo ($P = 0,16$ pri celicah ASC in $P = 0,15$ pri UC-MSK). Razlike med elektroporiranimi in neelektroporiranimi celicami so bile manjše kot pri poskusu na celicah ASC, ko smo testirali viabilnost 250 in 400 mM zunajcelične trehaloze, kjer smo dobili od 15 – 20 % razlike (Slika 7) (Dovgan in sod., 2017). Prav tako smo v študiji, ki smo jo objavili z Mutsenkom in sod. (2019), kjer smo sicer uporabili 400 mM trehalozo, po odmrzovanju opazili večje razlike, okrog 60 %, med elektroporiranimi (okrog 80 % preživetje) in neelektroporiranimi (okrog 20 % preživetje) celicami. Različne vrednosti viabilnosti med elektroporiranimi in neelektroporiranimi celicami pri poskusu na celicah ASC (pri testiranju 250 in 400 mM zunajcelične koncentracije trehaloze) ter pri poskusih na celicah ASC in UC-MSK (s koncentracijami zunajcelične trehaloze od 0 do 250 mM) bi lahko bile v nekoliko spremenjenem protokolu odmrzovanja celic, saj smo pri prvem za odmrzovanje uporabili 250 mM trehalozo, medtem ko smo pri poskusu na celicah ASC in UC-MSK (s koncentracijami zunajcelične trehaloze od 0 do 250 mM) za odmrzovanje uporabili 100 mM trehalozo. Druga razlika, v manjši razliki med elektroporiranimi in neelektroporiranimi celicami, v primerjavi s študijo z Mutsenkom in sod. (2019), bi lahko bila, da smo celice po elektroporaciji, ter tudi neelektroporirane celice, pred zamrzovanjem pustili inkubirati 30 minut na 37 °C, medtem ko so bile v študiji z Mutsenkom in sod. (2019) celice inkubirane le 2 minuti na sobni temperaturi. Kot so poročali Kinoshita in Tsong (1977) in Saulis (1997), je celjenje por časovno in temperaturno odvisno. Zanimive rezultate smo dobili tudi pri testiranju viabilnosti s testom MTT pri celicah UC-MSK, saj smo po

krioprezervaciji elektroporiranih celic dosegli 140 % viabilnost ter visoko viabilnost (110 %) tudi brez elektroporacije v primerjavi z DMSO. Test MTT deluje na principu določanja mitohondrijske metabolne aktivnosti, mitohondriji pa lahko postanejo hiperaktivni, če se zaradi stresa poruši celična homeostaza. Stres poveča mitohondrijsko biogenezo ter metabolno aktivnost mitohondrijev, kar posledično vodi do povišane redukcije MTT (Rai in sod., 2018) in s tem lažno pozitivnega rezultata visoke viabilnosti. Ugotovili smo, da so celice ASC in UC-MSC podvržene oksidativnemu stresu, ki ga povzročita elektroporacija in krioprezervacija, saj je bilo izražanje gena *sod2* povišano (Slika 17), s tem pa so tudi mitohondriji postali hiperaktivni, zaradi česar smo pri testiranju MTT najverjetneje dobili tako visoko celično viabilnost celic UC-MSC. Kljub stresu, ki ga povzroči krioprezervacija, pa celice zamrznjene z DMSO niso kazale znakov pretiranega oksidativnega stresa, saj je bilo izražanje *sod2* nižje kot pri drugih dveh protokolih. Krioprezervacija z DMSO očitno ne povzroča tako velikega oksidativnega stresa, saj so Wohnhaas in sod. (2019) zaznali podoben profil izražanja genov pri celicah zamrznjenih z DMSO in pri nezamrznjenih celicah.

5.3 DOLOČANJE ZNOTRAJCELIČNE KONCENTRACIJE TREHALOZE

Za potrditev hipoteze, da z elektroporacijo vnesemo v celico večjo količino trehaloze in s tem povečamo možnost preživetja celic po odmrzovanju, smo izmerili znotrajcelično koncentracijo trehaloze pri različno tretiranih celicah ASC in UC-MSC; z in brez elektroporacije, pred zamrzovanjem in po odmrzovanju ter pri različnih temperaturah inkubacije pred zamrzovanjem.

Iz rezultatov, ki smo jih dobili pri določanju znotrajcelične koncentracije trehaloze (Slika 10), smo pred zamrzovanjem pri neelektroporiranih celicah zaznali okrog 10 mM znotrajcelično trehalozo, medtem ko smo pri elektroporiranih celicah izmerili okrog 40–50 mM trehalozo. Po odmrzovanju je pri neelektroporiranih celicah koncentracija trehaloze narasla na 20–50 mM in pri elektroporiranih celicah na okoli 50–90 mM, kjer je naraščala z naraščajočo temperaturo inkubacije. V vseh primerih opazimo, da je vnos trehaloze odvisen od temperature. Kinoshita in Tsong (1977) sta poročala, da se celična membrana po elektroporaciji hitreje zaceli, če je nekaj časa izpostavljena temperaturi 37 °C. Kljub temu pred zamrzovanjem nismo zaznali statistično značilne razlike pri vnosu trehaloze v celico, če so bile celice izpostavljene različnim temperaturam. Po krioprezervaciji smo opazili večji vnos trehaloze v celico kot pred zamrzovanjem ter naraščanje koncentracije trehaloze z naraščajočo inkubacijsko temperaturo. Največ znotrajcelične trehaloze po odmrzovanju smo opazili pri 37 °C ter najmanj pri 4 °C. Po krioprezervaciji se vnos trehaloze najverjetneje poveča zaradi termotropno lipidno faznega prehoda med postopkom zamrzovanja/odmrzovanja. Podoben pojav so opazili tudi raziskovalci na pankreasnih otočjih, endotelijskih celicah ter fibroblastih (Beattie in sod., 1997; Campbell in Brockbank, 2012; Zhang in sod., 2016). Pri termotropnem lipidno-faznem prehodu postane membrana

bolj prepustna in dopusti dotok trehaloze v smeri koncentracijskega gradienta, torej v notranjost celice.

Pred krioprezervacijo smo pri neelektroporiranih celicah opazili zelo rahlo naraščanje vnosa trehaloze s povečevanjem inkubacijske temperature pri obeh tipih celic, kar bi lahko nakazovalo, da trehaloza lahko vstopi v celico s pinocitozo (ali tekočinsko endocitozo). Po odmrzovanju pri neelektroporiranih celicah opazimo še večji vnos trehaloze z naraščajočo inkubacijsko temperaturo. V primeru pinocitoze trehaloza pride v celico z veziklom, ki se odcepi od membrane. Da se lahko vezikel odcepi od membrane, mora biti zagotovljena fluidnost membrane. Oliver in sod. (2004) so ugotovili, da imajo membrane celic MMC točki faznega prehoda iz tekočega v gel stanje pri 15 in 35 °C. To pomeni, da membranski lipidi postajajo vse bolj urejeni z nižjo temperaturo pod 20 °C in do 15 °C, ko preidejo v gel stanje. Pinocitoza pa je hitrejša z višanjem temperature. Najvišjo raven pinocitoze celic MMC so izmerili pri 33 °C, nato pa pri 35 °C pinocitoza doseže plato in višja temperatura ne doprinese več k hitrejši pinocitozi. Poročali so tudi, da so s pinocitozo vnesli 20 – 30 mM trehalozo v celice MMC, le da jih pri tem niso zamrzovali. Ugotovili so, da pinocitozni inhibitorji, kot sta kolhicin in nokodazol, ki depolimerizirata mikrotubule, ustavijo vnos trehaloze. DMSO, ki na mikrotubule vpliva drugače in sicer tako, da jih oblikuje v kratke in večje skupke, prav tako ustavi vnos trehaloze. Medtem pa citohalasin B, ki depolimerizira aktinske filamente in ustavi makropinocitozo in kalveolno-odvisno pinocitozo, na vnos trehaloze ni vplival. Amilorid, ki blokira natrijeve kanalčke in inhibira klatrinsko-odvisno pinocitozo, prav tako ni preprečil vnosa trehaloze. Celice MMC torej lahko vnesejo trehalozo s klatrinsko odvisnim pinocitoznim mehanizmom, ki je poleg tega odvisen od mikrotubulov, ne pa tudi od aktinskih filamentov. Podoben vnos trehaloze so dosegli tudi Zhang in sod. (2010), ko so po 24-urni inkubaciji v 100 mM trehalozi v celice MMC vnesli okrog 14 mM trehalozo. Celice so sicer liofilizirali in kljub temu dosegli 70 % preživetje, čeprav so bile celice funkcionalno precej oslABLJENE. Prav tako Campbell in Brockbank (2012) govorita o klatrinsko odvisnem pinocitoznem mehanizmu, s katerim sta v celice dovedla 13 mM trehalozo po 24-urni inkubaciji v 0,2 M trehalozi in krioprezervaciji v 0,2 – 0,4 mM trehalozi, pri čemer sta dosegla okrog 87 % metabolno aktivnost endotelijskih celic. Kot rečeno je pinocitoza temperaturno odvisna zato bi morali pri višji temperaturi opaziti večji vnos trehaloze v celice. V našem primeru so bile celice izpostavljene trehalozi le 30 min, medtem ko so druge skupine inkubirale celice v trehalozi 24 h. Da bi opazili večje razlike pri različnih inkubacijskih temperaturah, bi najverjetneje morali tudi v našem primeru celice v trehalozi inkubirati dlje časa. Večji vnos trehaloze po odmrzovanju kot pred zamrzovanjem smo opazili tako pri neelektroporiranih in elektroporiranih celicah. Ta pojav gre najverjetneje pripisati faznemu prehodu med procesoma zamrzovanja in odmrzovanja, ne pa pri samem ohlajanju pri temperaturah 30 – 10 °C predvsem ne v precejšnji meri. Do podobnih opažanj so pri fibroblastih prišli tudi Zhang in sod. (2016). Kot poročajo, se prepustnost membrane drastično spremeni pri nizkih temperaturah ob tvorbi ledu, kar vpliva na prepustnost vode in drugih molekul, zato je fazni prehod med zamrzovanjem drugačen

od tistega pri ohlajanju (Akhoondi in sod., 2012; Zhang in sod. 2016). Kot razlagajo Zhang in sod. (2016), lahko vnos molekul med zamrzovanjem poleg faznega prehoda pripišemo kombinaciji osmotskih sil in membranskih nepopolnosti, ki jih povzroči tvorba zunajceličnega ledu. Vsekakor pa je trebno poudariti, da majhne razlike v velikosti ali številu celic močno vplivajo na izračun koncentracije znotrajcelične trehaloze. V tej študiji prikazani podatki so torej zgolj ocene in ne absolutne vrednosti koncentracije znotrajcelične trehaloze.

Koncentracijo znotrajcelične trehaloze smo izmerili tudi po gojenju celic v kulturi. Že po prvi pasaži trehaloze v celicah nismo več zaznali. Kljub temu, da človeške celice nimajo encima trehalaze, ki bi presnovil trehalozo, je pri gojenju *in vitro* nismo zaznali. Zato predvidevamo, da je izločanje trehaloze potekalo z eksocitozo. Prav tako mnogo različnih celic, kot so na primer fibroblasti, endocitira velike količine njihove celične membrane in celičnega volumna. Da pri tem ohranijo enak celični volumen, mora biti proces endocitoze usklajen z eksocitozo (Steinman in sod., 1983; Swanson in sod., 1985; Oliver in sod., 2004).

Glede na pridobljene rezultate celične viabilnosti in izmerjene koncentracije znotrajcelične trehaloze lahko rečemo, da zadostno celično viabilnost po krioprezervaciji omogoča že 20–50 mM znotrajcelična koncentracija trehaloze, ki jo dosežemo tudi brez elektroporacije. Z elektroporacijo pa v celico vnesemo okrog 50–90 mM trehaloze, kar poveča celično viabilnost po krioprezervaciji za približno 10 %. Poleg tega večji vnos trehaloze v celico dosežemo z višjo temperaturo inkubacije. Kljub temu menimo, da mora celični pripravek za zdravljenje pacienta vsebovati največje možno število živih celic, zato 10 % višja viabilnost znatno doprinese k boljši kakovosti terapevtskega produkta.

5.4 CELIČNA MORFOLOGIJA IN DIFERENCIACIJA

Celično morfologijo (obliko celic) smo med poskusi večkrat preverjali. Morfologija tretiranih celic z elektroporacijo in 250 mM trehalozo je bila vedno primerljiva s kontrolnimi celicami tako pred kot po odmrzovanju. Na slikah 11 in 12 je prikazana morfologija celic pred in po odmrzovanju kontrolnih, neelektroporiranih in elektroporiranih celic. Pri vseh celicah lahko opazimo, da je morfologija primerljiva. Po odmrzovanju opazimo, da je v neelektroporiranih celicah več mrtvih – okroglih celic, kar sovпада z rezultati preživetja celic po odmrzovanju; najnižje viabilnosti smo dobili pri neelektroporiranih celicah (sliki 8 in 9). Osteogena, adipogena ali hondrogena diferenciacija celic v različne linije je bila v literaturi že večkrat opisana tako pri celicah UC-MSC (Ma in sod., 2019; Shen in sod., 2019) in ASC (Ryden in sod., 2003; Wagner in sod., 2005). Ker pa trehaloza ni molekula, ki bi bila naravno prisotna v človeških celicah (Campbell in Brockbank, 2012; Crowe J. H. in Crowe L. M., 2000), smo preverjali vpliv trehaloze in elektroporacije na sposobnost diferenciacije celic ASC in UC-MSC v osteogeno in adipogeno linijo. Iz slik 13 in 14, kjer je prikazana adipogena diferenciacija ASC, vidimo, da so celice, ki so bile izpostavljene indukcijskemu mediju, začele tvoriti redeče obarvane maščobne kapljice, kar pomeni, da so se adipogeno

diferencirale. Medtem ko pri neinduciranih celicah ne opazimo tvorbe maščobnih kapljic. Podobne rezultate smo dobili pri vseh testiranih protokolih. Pri celicah UC-MSC je tvorba maščobnih kapljic manj izrazita, vendar kljub temu dovolj, da so celice ohranile svojo funkcionalnost. Pri opisu diferenciacije celic UC-MSC v literaturi poročajo, da se celice izolirane iz različnih delov popkovnice diferencirajo različno (Ma in sod., 2019; Shen in sod., 2019).

Pri testiranju osteogene diferenciacije, kjer smo dokazovali prisotnost kalcija, smo dobili podobne rezultate kot pri adipogeni diferenciaciji. Neinducirane celice niso tvorile depozitov kalcija, medtem ko so inducirane celice pri vseh testiranih protokolih tvorile kalcij v obliki hidroksiapatita v visokih koncentracijah. Celično diferenciacijo ASC smo testirali pri koncentracijah trehaloze 250 in 400 mM v kombinaciji z elektroporacijo. Pri vseh testiranih protokolih smo dobili podobne rezultate, kar pomeni, da višja koncentracija trehaloze ni vplivala na funkcionalnost celic. Tudi drugi raziskovalci poročajo, da trehaloza nima negativnega vpliva na funkcionalne sposobnosti celic, kot so proliferacija (Campbell in Brockbank, 2012), klonogenost (Buchanan in sod., 2004), fertilizacija in razvoj embrijev (Eroglu in sod., 2008) ter spermatogeneza (Lee in sod., 2013). Glede na rezultate diferenciacije prav tako lahko rečemo, da elektroporacija ni imela negativnega vpliva na funkcionalne lastnosti celic. Tako poroča tudi Hernández in sod. (2004), kjer so preverjali funkcionalnost endotelijskih celic po elektroporaciji. Vse celice so ohranile svoj diferenciacijski potencial tudi po odmrzovanju.

5.5 ANALIZA IZRAŽANJA STRESNIH GENOV

Celični odziv na stres je lahko zelo različen, od tega, da aktivira celično preživetje, do tega, da celice aktivira v programirano celično smrt (Fulda in sod., 2010). V naši študiji smo preverjali, kako vpliva stres, povezan z elektroporacijo in krioprezervacijo, na oba celična tipa (Slika 17). Testirali smo ekspresijo genov, ki so vključeni v apoptozo (*bcl2*), okvaro DNA (*tp53*), stres (»heat shock« - *hspb2* in *hspa1a*) ter oksidativni stres (*sod2*). Glede na pridobljene rezultate elektroporacija in krioprezervacija nista bistveno vplivali na izražanje antiapoptotičnih genov *bcl2* in *tp53* ter stresnega gena *hspb2*.

V normalnih celičnih razmerah obstaja ravnovesje med pro-oksidanti in antioksidanti, med drugim v obliki metabolnih encimov (npr. SOD2), ki uravnavajo reaktivne kisikove spojine (ROS – angl. reactive oxygen species). Oksidativni stres se pojavi, ko je moteno ravnovesje med pro-oksidanti in antioksidanti v različnih bioloških in patoloških procesih (Fulda in sod., 2010). Za elektroporacijo je dobro znano, da pri dolgih pulzih (0,1 – 15 ms) (Bonnafoous in sod., 1999; Gabriel in sod., 1994) in nanosekundnih pulzih (Nuccitelli in sod., 2013; Pakhomova in sod., 2012) stimulira nastanek ROS produktov v različnih sesalskih celičnih linijah. Pri našem delu sicer nismo direktno kvantificirali porasta ROS v celicah, ampak smo merili spremembe v izražanju gena *sod2*. Ta gen je član mitohondrijske družine

železo/mangan superoksid dismutaze in je odgovoren za odstranjevanje ROS iz mitohondrijev, s čimer ščiti celico pred apoptozo in celično smrtjo (Pias in sod., 2003).

Povečanje izražanja gena *sod2* smo opazili kmalu po elektroporaciji celic pri obeh celičnih tipih. Povečanje izražanja gena je časovno odvisno in narašča vse do 12 ur, kolikor je zajemal časovni interval naših meritev. Po odmrzovanju elektroporiranih celic je bilo izražanje *sod2* še višje kot pred zamrzovanjem. Tudi samo zamrzovanje v prisotnosti trehaloze brez elektroporacije je močno povišalo izražanje *sod2*. Kot kažejo rezultati, zamrzovanje z DMSO povzroči manj oksidativnega stresa glede na izražanje gena *sod2*. Vendar je bil pri teh testiranih vzorcih časovni potek genske ekspresije obratno sorazmeren; izražanje *sod2* je upadalo pri neelektroporiranih celicah, medtem ko je naraščalo pri elektroporiranih celicah. Pomen tega fenomena na funkcionalne lastnosti celic MMC še ni bil preučen.

Stresni proteini Hsp so iz družine proteinov, ki jih celice tvorijo pri odzivu na različne stresne situacije in ne le v povezavi s temperaturnimi spremembami, kot bi bilo sklepati iz imena (angl. »heat shock proteins«). Naraščajoč odziv ekspresije gena *hspa1b* (član družine Hsp70 proteinov) je bil opisan že pri elektroporaciji maligne melanomske celične linije SK-MEL28 (Mlakar in sod., 2009). Prav tako so povečanje izražanja genov *hsp70a* in *hsp70b* po krioprezervaciji s 5 % DMSO, opisali François in sod. (2012) na celicah MMC iz kostnega mozga. Kot so opisali avtorji, naj bi odziv na stres krioprezervacije začasno preprečil odziv celic MMC na imunske signale in sekundarne imunomodulacijske funkcije. V našem primeru smo analizirali izražanje gena *hspa1a*, ki je član družine Hsp70 in gena *hspb2* iz družine malih stresnih proteinov. Izražanje gena *hspb2* se ni spreminjalo med različnimi testiranimi protokoli. Pokazale pa so se razlike pri izražanju *hspa1a* med različnima celičnima tipoma. Pri celicah ASC je izražanje *hspa1a* zelo naraslo po 3 urah po odmrzovanju celic. Največje izražanje *hspa1a* smo opazili pri celicah, ki so bile zamrznjene v trehalozi brez elektroporacije. Celice, elektroporirane v prisotnosti trehaloze, so tudi izražale visoke ravni gena *hspa1a*, izražanje pa je naraščalo s testiranimi časovnimi točkami. Da so celice podvržene tako termalnemu kot elektroporacijskem stresu, so ugotovili tudi Forjanič in sod. (2019), saj so zaznali povišano izražanje gena *hspa1b* pri transgenih miših Hspa1b-LucF (+/+) Hspa1b-mPlum (+/+) po *in vivo* elektroporaciji pri določanju vpliva zunanega stresa genske elektrotransfekcije. Najnižje še biološko pomembno izražanje smo opazili pri celicah zamrznjenih z DMSO. Povečano izražanje *hspa1a* pri celicah UC-MSC smo opazili le po 12 urah, najvišje izražanje gena pa smo zaznali pri elektroporiranih celicah po krioprezervaciji. Pri krioprezervaciji celic s trehalozo in brez elektroporacije ter z DMSO smo opazili podobne spremembe v izražanju gena *hspa1a*. V splošnem je bila raven izražanja gena *hspa1a* višja pri celicah ASC kot pa pri celicah UC-MSC. Čeprav imajo celice MMC izolirane iz različnih virov veliko podobnosti v izražanju imunskega fenotipa in diferenciacijskih sposobnosti, vseeno obstajajo razlike v transkriptomu, sekretomu ter tako *in vitro*, kot tudi *in vivo* funkcionalnosti (Burja in sod., 2020; Grégoire in sod., 2019; Hu in sod., 2013). Poleg tega različne študije kažejo, da lahko oksidacija membranskih komponent zaradi elektroporacije izzove oksidativni stres, ki poveča občutljivost celične membrane.

Elektroporacija povzroči na membranskih lipidih kemijske spremembe, vključno s peroksidacijo, ta pa deformira njihove repe in poveča prepustnost dvosloja za vodo, ione in male molekule (Kotnik in sod., 2019; Vernier in sod., 2009; Gabriel in sod., 1994). Ker se različni celični tipi lahko razlikujejo v strukturi celične membrane in sestave membranskih lipidov, je lahko tudi učinkovitost elektroporacije na različne celice drugačna. Različnost membranske sestave matičnih celic iz različnih virov (maščobno tkivo, popkavnica, kostni mozeg,...) še ni bila raziskana. Kljub temu pa je znano, da se s staranjem v *in vitro* kulturi spreminja vsebnost in sestava maščobnih kislin membranskih lipidov (Kilpinen in sod., 2013; Chatgialiloglu in sod., 2017). Različna sestava celične membrane in posledično različna prepustnost pri celicah ASC in UC-MSK bi lahko bila razlog za opažene razlike v izražanju stresnih genov (*hspa1a*), viabilnosti ali vnosu znotrajcelične trehaloze.

5.6 IZRAŽANJE GENOV Z AKTIVACIJO VNETNIH FAKTORJEV

Imunosupresivne sposobnosti sveže odmrznjenih celičnih pripravkov igrajo bistveno vlogo pri klinični učinkovitosti terapevtskih pripravkov. Večina MMC-celičnih terapij za zdravljenje različnih obolenj, kot so kardiovaskularne in avtoimunske bolezni, izkorišča njihove trofične, parakrine in imunomodulacijske funkcije (Murphy in sod., 2013). Celice MMC sami po sebi niso imunosupresivni, pač pa potrebujejo neko aktivacijo – vnetno okolje, da spremenijo izražanje svojega nabora imunomodulacijskih molekul. Med najpomembnejše aktivacijske faktorje spadajo $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ in $\text{IL-1}\beta$ (Zachar in sod., 2016; Krampera, 2011). Ob aktivaciji začnejo celice MMC izražati različne bioaktivne molekule, ki so sposobne modulirati vnetje. Mednje spadajo IDO , TSG6 , $\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL10 , IL6 , PGE2 ter mnoge druge (Zachar in sod., 2016; Krampera, 2011; Lee in sod., 2014a). Pri naši študiji smo za aktivacijo celic ASC in UC-MSK vzpostavili vnetno okolje z dodatkom $\text{IFN}\gamma$ in $\text{TNF}\alpha$. Spremembe v genski ekspresiji med neaktiviranimi in aktiviranimi celicami so pokazale, da se naše celice odzovejo na vnetni dražljaj. Ugotovili smo, da je bilo med testiranimi geni izražanje genov *ido* in *tsg6* najvišje. IDO je encim, ki ima veliko vlogo pri imunskem odzivu; poleg tega, da deluje obrambno proti mikroorganizmom, po indukciji z $\text{IFN}\gamma$ zavira tudi funkcijo T-limfocitov in deluje kot imunosupresor (Ren in sod., 2009). TSG6 je protein, ki ga inducira $\text{TNF}\alpha$ in deluje protivnetno, predvsem pri pacientih z artritidom (Milner in Day, 2003). Visoko izražanje gena *ido* smo zaznali pri vseh testiranih protokolih, povečano izražanje *tsg6* pa je bilo najbolj izrazito pri celicah zamrznjenih s trehalozo. Če primerjamo le med različnimi postopki zamrzovanja, ugotovimo, da dobimo pri DMSO-ju najnižje izražanje obeh genov (*ido* in *tsg6*). Višje izražanje *ido* in *tsg6* smo opazili pri celicah zamrznjenih s trehalozo, pri *ido* pa tudi pri souporabi elektroporacije. Ti rezultati so vzpodbudni, saj celice MMC zamrznjene z DMSO po odmrzovanju kažejo oslABLJENE imunomodulacijske lastnosti, kar lahko vpliva na kvaliteto odmrznjenih celičnih pripravkov za zdravljenje (Moll in sod., 2014; François in sod., 2012). Zato raziskovalci iščejo načine, kako izboljšati imunomodulacijske sposobnosti celic MMC namenjenih za zdravljenje (Boyt in sod., 2020; Witte in sod., 2017; Chinnadurai in sod., 2016). Ena izmed

možnosti bi torej lahko bila, da se celice namesto z DMSO zamrzne v trehalozi (z elektroporacijo) ter tako poveča imunomodulatorne sposobnosti celic MMC po odmrzovanju. V naši raziskavi zamrzovanje s trehalozo ni imelo negativnega vpliva na izražanje *ido* in *tsg6* in drugih genov, kljub povišanemu oksidativnemu stresu in izražanju gena *hspa1a*. Ti rezultati nakazujejo potrebo po nadaljnjih raziskavah opisanega fenomena s pristopom funkcijskih bioanaliz, kot je t.i. mešana limfocitna reakcija (angl. »Mixed Lymphocyte Reaction« - MLR), analiza sekretoma in analiza izražanja površinskih označevalcev (Galipeau in sod., 2016; de Wolf in sod., 2017). Ekspresija drugih genov, razen *il10*, ki ima vpliv na več lastnosti – na vnetje, imunski odziv in hematopoezo (Tanaka in sod., 2014), se ni bistveno razlikovala med drugimi protokoli zamrzovanja.

5.7 ZAMRZOVANJE TKIVA POPKOVNICE

Zamrzovanje tkiv, organov in celo človeka, ki bi po odmrzovanju ohranili vitalne funkcije, že dolgo buri domišljijo ljudi. Uspešno zamrzovanje velikega tkiva ali organa omejuje več faktorjev, od tega kako zagotoviti enakomerno ohladitev v notranjosti, kako zagotoviti difuzijo krioprotektanta znotraj tkiva in pri tem preprečiti tvorbo kristalov ter predvsem tudi kako varno odmrzniti tkivo. Kljub tem vprašanjem, s katerimi se znanost srečuje, obstajajo podjetja (npr. The Cryonics Institute, Alcor Life Extension Foundation, KrioRus), ki trdijo, da lahko uspešno zamrznejo človeka pri temperaturah pod $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ohranijo njegove funkcije. Legalno krioprezervirajo klinično mrtve ljudi zaradi različnih težkih bolezenskih stanj v upanju, da bodo nekoč v prihodnosti dobili ustrezno zdravljenje in lahko živeli dalje. Zaenkrat niso (uspešno) odmrznili še nikogar. S takšnimi »težavami« se s tem doktorskim delom nismo ukvarjali, pač pa smo se usmerili na vprašanje o dolgotrajnem shranjevanju tkiva popkovnice s krioprezervacijo.

Zamrzovanje tkiva popkovnice prinaša številne prednosti in izzive v primerjavi z zamrzovanjem izoliranih celic (Arutyunyan in sod., 2018). Tkivo popkovnice je bilo že večkrat uspešno zamrznjeno, vendar je bil kot glavni krioprotektant vedno uporabljen DMSO (Arutyunyan in sod., 2018). Trehaloza kot krioprotektant pri krioprezervaciji tkiva je bila uporabljena pri zamrzovanju maščobnega tkiva (Pu in sod., 2005; Cui in sod., 2007), kozjih in prašičjih testisov (Xi in sod., 2019; Lee in sod., 2014b), celotnega tkiva jajčnikov ribe in ovce (Marques in sod., 2019; Du in sod., 2015) ter tkivno-inženirskega konstrukta epidermisa (Chen in sod., 2011). V večini primerov je bila trehaloza uporabljena v kombinaciji z DMSO in pri koncentracijah od 50 do 400 mM, le v primeru maščobnega tkiva je bila uporabljena samostojno (Pu in sod., 2005). V vseh primerih je izboljšala možnosti preživetja tkiva in njegove nadaljnje uporabe po krioprezervaciji. Prav tako se trehaloza uporablja v primeru hladne prezervacije organov. Na Japonski univerzi Kyoto so razvili trehalozo vsebujočo raztopino za hladno prezervacijo organov, s katero so uspešno povečali preživetje pasjih pljuč, podganjih jeter ter človeškega pankreasa (Chen in sod., 2004; Zhao in sod., 2008; Noguchi in sod., 2010).

V okviru naše študije smo želeli DMSO nadomestiti z elektroporacijo v kombinaciji s trehalozo ter primerjati ali lahko tudi s tem postopkom dosežemo podobno uspešno krioprezervacijo kot z DMSO. Uporabo elektroporacije v krioprezervaciji tkiv smo zasledili, ko je skupina iz Tokia (Rahman in sod., 2013) poskušala zamrzniti živalske zarodke v velikosti do 1 mm. Z elektroporacijo so želeli povečati perfuzijo DMSO v celice zarodka, vendar je bila krioprezervacija neuspešna.

V naši študiji smo z DMSO uspešno zamrznili tkivo popkavnice in po odmrzovanju pridobili žive celice. Pri krioprezervaciji s trehalozo in elektroporacijo pa smo ugotovili, da elektroporacija vpliva na še sveža tkiva, saj pri visoki jakosti električnega polja (2 kV/cm) že pred zamrzovanjem nismo pridobili živih celic. Višjo jakost električnega polja smo izbrali, da bi omogočili boljši prodor in distribucijo trehaloze v tkivu, kar pa se ni izkazalo najbolje, saj je očitno visoko električno polje uničilo celice v svežem tkivu. Z znižanjem napetosti na 1,5 kV/cm smo uspešno elektroporirali celice, ki so pred zamrzovanjem povečini ostale žive. Kljub temu pa zamrzovanja niso uspešno prestale, saj po odmrzovanju nismo zaznali viabilnih celic. Za detekcijo živih – metabolno aktivnih celic smo uporabili tudi barvanje z MTT. S tem testom smo dobili pozitiven rezultat pri nekaterih vzorcih, kjer pred barvanjem nismo opazili adherentnih celic. Na tkivu so se tvorili vijolični kristali, kar lahko pomeni, da so celice začele izraščati po tkivu in (še) niso migrirale na dno gojilne posode, zaradi česar jih prej nismo zaznali. Detekcijo živih celic tako svežih kot takoj po odmrzovanju, smo pokušali izmeriti tudi z različnimi fluorescentnimi barvili (PI, SYTO™ 9, kalcein, CellTracker™ (Invitrogen)), vendar žal neuspešno kljub temu, da smo jih dodali pred elektroporacijo, saj so očitno vsa barvila prevelika za penetracijo v tkivo.

Z našo predpostavko, da z elektroporacijo dosežemo večjo propustnost tkiva za boljšo distribucijo trehaloze znotraj tkiva, nismo uspešno zamrznili tkiva popkavnice. Najverjetnejši razlog tiči v tem, da je sama struktura popkavnice zelo čvrsta in želatinasta, kar preprečuje vnos trehaloze. Da bi pri zamrzovanju tkiva popkavnice lahko uspešno nadomestili DMSO z elektroporacijo in trehalozo, bi morali opraviti dodatne raziskave.

6 SKLEPI

Namen naše raziskave je bil pripraviti postopek zamrzovanja, ki ne bi vključeval toksičnega DMSO-ja ter živalskih komponent. Zato smo v raziskavi kot krioprotektant uporabili netoksično trehalozo, ki smo jo v celice vnesli z elektroporacijo. Zanimalo nas je ali lahko s kombinacijo trehaloze in elektroporacije uspešno zamrznemo celice in ali po odmrzovanju pridobimo dovolj visoke viabilnosti, pri tem pa ohranimo funkcionalne lastnosti celic. Naši sklepi so:

- optimalno jakost električnega polja, ki ji dovedemo celicam, smo določili pri 1,5 kV/cm. V teh razmerah je membrana celic dovolj prepustna za vnos trehaloze, ohrani pa se tudi dovolj visoka celična viabilnost.
- Z elektroporacijo v prisotnosti 250 mM zunajcelične trehaloze omogočimo prehod trehaloze v celice, kjer smo izmerili okrog 50–90 mM koncentracijo trehaloze. Po odmrzovanju znotrajcelična koncentracija trehaloze naraste tako pri elektroporiranih kot neelektroporiranih celicah in narašča z naraščajočo temperaturo inkubacije. Povečan vnos trehaloze po odmrzovanju gre najverjetneje pripisati faznemu prehodu membrane med zamrzovanjem/ odmrzovanjem.
- Višjo, sicer ne statistično značilno, celično viabilnost celic po odmrzovanju dosežemo pri celicah, v katere smo vnesli trehalozo z elektroporacijo, kot pa pri neelektroporiranih celicah.
- Celice pred zamrzovanjem elektroporiramo pri 1,5 kV/cm v prisotnosti najmanj 250 mM trehaloze, po odmrzovanju pa dosežemo visoko celično viabilnost, ki je primerljiva s standardnim postopkom zamrzovanja z 10 % DMSO.
- Kombinacija elektroporacije in trehaloze, tako pred kot po odmrzovanju, nima vpliva na diferenciacijske lastnosti; celice so se diferencirale v adipogeno in osteogeno linijo. Prav tako celična morfologija ostaja nespremenjena.
- Elektroporacija in krioprezervacija povišata izražanje oksidativnega gena *sod2* in stresnega gena *hsp1a*. Zamrzovanje z DMSO povzroči manj oksidativnega stresa kot zamrzovanje s trehalozo z in brez elektroporacije. Izražanje gena *hsp1a* se razlikuje med različnima celičnima tipoma in je najmanj izraženo pri zamrzovanju z DMSO.
- Pri testiranju imunomodulacijskega odziva celic smo ugotovili, da elektroporacija in/ali krioprezervacija ne zavirata sposobnosti odziva celic na vnetno okolje. Med vsemi testiranimi geni smo izmerili najvišje izražanje *ido* in *tsg6*. Višje izražanje *ido*

in *tsg6* smo opazili pri celicah zamrznjenih s trehalozo, tako pri souporabi elektroporacije ali brez nje, kot pri celicah zamrznjenih z DMSO.

- Za krioprezervacijo matičnih celic bi z uporabo elektroporacije in trehaloze lahko nadomestili uporabo toksičnega krioprotektanta DMSO v živalskem serumu.
- Optimiziranih razmer elektroporacije in trehaloze, ki smo jih dobili za uspešno zamrzovanje celic, ne moremo neposredno prenesti na tkivo popkovnice. Pri zamrzovanju tkiva popkovnice smo uspešno odmrznili le tkivo zamrznjeno z DMSO. Z elektroporacijo ne dosežemo povečane prepustnosti tkiva za uspešen vnos trehaloze, ki bi celice in tkivo zaščitila med zamrzovanjem.

7 POVZETEK

7.1 POVZETEK

Razvoj celičnih terapij je vse bolj razširjen, priprava kvalitetnih celičnih produktov za zdravljenje pacientov pa mora slediti strogim smernicam regulatornih organov. Poleg vseh zahtev je za kvaliteten celični produkt pomembno tudi primerno shranjevanje celic. Za dolgotrajno shranjevanje celic je najprimernejša krioprezervacija pri ultra nizkih temperaturah, pri čemer se kot krioprotektant največkrat uporablja 10 % DMSO, ki pa je toksičen za celice. Za zdravljenje se velikokrat uporablja sveže odmrznjen celični pripravek, ki se ga intravenozno aplicira v pacienta brez odstranjevanja DMSO, kar lahko poslabša pacientovo stanje ali izzove druga bolezenska stanja. V naši raziskavi smo želeli pripraviti postopek krioprezervacije brez DMSO in FBS, ki je živalskega izvora in se ga največkrat dodaja k DMSO. Uporabili smo sladkor trehalozo ter reverzibilno elektroporacijo. Trehaloza deluje kot krioprotektant in je v naravi prisotna v številnih ekstremofilnih organizmih, predvsem tistih, ki so izpostavljeni nizkim temperaturam ali sušnemu okolju. Številne študije so pokazale, da mora biti za uspešno krioprezervacijo trehaloza prisotna na obeh straneh celične membrane. Ker pa trehaloza v človeških celicah ni prisotna in praktično ne more prehajati skozi celično membrano, so raziskovalci poskušali vnesti trehalozo v celično notranjost na različne načine. V naši raziskavi smo se odločili, da jo v celice vnesemo z relativno enostavnim postopkom reverzibilne elektroporacije. Pri elektroporaciji celico izpostavimo električnemu polju, ki začasno poveča prepustnost celične membrane za molekule, ki drugače ne prehajajo ali težko prehajajo membrano ter tako omogoči vnos tudi trehalozi. Trehalozo smo v naši raziskavi z elektroporacijo uspešno vnesli v celice ASC in UC-MSC. Med raziskavo smo določili amplitudo električnega pulza in optimalno količino trehaloze, ki po krioprezervaciji zagotavlja dovolj visoko viabilnost celic. Za zagotavljanje dovolj visoke prepustnosti celične membrane in viabilnosti celic je potrebno dovajanje električnih pulzov pri jakosti električnega polja 1,5 kV/cm. Pri zamrzovanju celic pri različnih koncentracijah trehaloze smo ugotovili, da mora biti za uspešno krioprezervacijo prisotna vsaj 250 mM zunajcelična trehaloza ter da z naraščajočo koncentracijo trehaloze narašča tudi celična viabilnost. Rezultati so bili primerljivi s standardnim protokolom zamrzovanja z 10 % DMSO. V naši študiji pa smo dobili zanimive rezultate tudi pri krioprezervaciji celic, kjer elektroporacije nismo uporabili, temveč smo celice le zamrznili v prisotnosti 250 mM trehaloze. Opazili smo le okoli 10 % nižje viabilnosti po odmrzovanju celic v primerjavi z elektroporiranimi celicami v prisotnosti trehaloze, ki sicer niso bile statistično značilna ($P = 0,16$ pri celicah ASC in $P = 0,15$ pri UC-MSC). Kljub temu smo v študiji, ki smo jo opravili v sodelovanju dobili večje razlike, okrog 60 % med elektroporiranimi in neelektroporiranimi celicami. Tudi sama trehaloza torej dobro zaščiti celice med krioprezervacijo. Zato smo z naslednjim poskusom želeli ugotoviti, koliko znotrajcelične trehaloze uspemo dovesti z elektroporacijo ali brez nje. Pri določanju

znotrajcelične koncentracije trehaloze smo ugotovili, da je v celicah po elektroporaciji okoli 40–50 mM koncentracija trehaloze. Po zamrzovanju znotrajcelična koncentracija trehaloze naraste na okoli 50–90 mM. Trehaloza torej uspe priti v celico tudi med faznim prehodom celične membrane pri zamrzovanju/odmrzovanju in celico uspešno dodatno zaščiti. Večji vnos trehaloze po krioprezervaciji smo dobili pri inkubaciji pred zamrzovanjem pri višjih temperaturah (25 in 37 °C) v primerjavi z nižjimi (4 °C), kar lahko doprinese k večjemu preživetju celic po odmrzovanju. S preverjanjem celične morfologije (oblike), testiranjem diferenciacijskih lastnosti, izražanja stresnih genov in preverjanjem sposobnosti imunomodulacije z izražanjem genov po aktivaciji z vnetnimi faktorji smo ugotavljali ali trehaloza, elektroporacija ali zamrzovanje celic vplivajo na funkcionalne lastnosti celic. Ugotovili smo, da trehaloza, elektroporacija ali zamrzovanje celic ne vplivajo na celično morfologijo in diferenciacijske sposobnosti. Vse celice, ki so bile obravnavane po različnih protokolih, so se uspešno diferencirale tako v adipogeno kot osteogeno linijo. Pri testiranju izražanja stresnih genov smo ugotovili, da elektroporacija in krioprezervacija nista bistveno vplivali na izražanje antiapoptotičnih genov *bcl2* in *tp53*. Prav tako se izražanje stresnega gena *hspb2* ni spreminjalo pri različnih testiranih protokolih. Močan vpliv pa imata elektroporacija in krioprezervacija na izražanje gena *sod2*, ki je odgovoren za preprečevanje oksidativnega stresa v celici. Po primerjavi izražanja *sod2* med različnimi protokoli smo ugotovili, da zamrzovanje z DMSO povzroči manj oksidativnega stresa kot zamrzovanje s trehalozo in elektroporacijo ali pa celo zamrzovanje s samo trehalozo. Izražanje stresnega gena *hspala* se precej razlikuje med različnima celičnima tipoma in testiranimi parametri. Izražanje *hspala* je bilo časovno odvisno in je naraščalo s časom, in sicer je bilo največje pri celicah ASC po odmrzovanju neelektroporiranih celic, nekoliko nižje pri elektroporiranih celicah, najmanj pa pri celicah zamrznjenih z DMSO. Pri celicah UC-MSK izražanje gena *hspala* ni bilo biološko pomembno in smo šele po 12 urah po odmrzovanju zaznali nekoliko povečanje izražanja gena in sicer največ pri elektroporiranih celicah. Pri testiranju imunomodulacijskega odziva celic ASC in UC-MSK smo celice aktivirali z izpostavitvijo vnetnima citokinoma IFN γ in TNF α . Ob aktivaciji celic MMC začnejo izražati različne bioaktivne molekule, ki so sposobne imunomodulirati vnetje (IDO, TSG6, TGF β , TNF α , IL10, IL6). Ugotovili smo, da se testirane celice odzovejo na vnetni dražljaj. Med vsemi vzorci smo dobili najvišje izražanje genov *ido* in *tsg6*. Višje izražanje v primerjavi z zamrzovanjem z DMSO smo opazili pri celicah zamrznjenih s trehalozo tako pri souporabi elektroporacije ali brez nje. Ti rezultati so vzpodbudni, saj celice MMC zamrznjeni z DMSO po odmrzovanju kažejo oslABLJENE imunomodulacijske lastnosti, kar lahko domnevno vpliva na učinkovitost odmrznjenih celičnih pripravkov za zdravljenje. Ekspresija drugih genov, razen *il10*, se ni bistveno razlikovala od drugih protokolov zamrzovanja. Na koncu pa smo poskusili zamrzniti še tkivo popkovnice v razmerah, ki smo jih uporabili pri zamrzovanju celic. Predpostavili smo, da z elektroporacijo lahko povečamo prepustnost tkiva za prehod trehaloze tako znotraj tkiva kot v celice. Vendar tega učinka nismo dosegli, najverjetneje zaradi želatinaste strukture popkovnice. Za uspešno krioprezervacijo tkiva popkovnice elektroporacija in trehaloza pri naših parametrih nista dovolj učinkovita, medtem ko smo

uspešno zamrznili tkivo popkovnice z zamrzovanjem z 10 % DMSO, kot je to uspelo tudi drugim raziskovalnim skupinam.

7.2 SUMMARY

Cell therapies are becoming more and more interesting for patient treatment, therefore cell products must follow strict guidelines of regulatory bodies. Adequate cell storage is one of the main requirements to develop high grade quality cell products. For long-term cell storage process cryopreservation at ultra-low temperatures is appropriate, where the most commonly used cryoprotectant is 10% DMSO, even though it is toxic to cells and patients. Most of cell products are freshly thawed and infused into the patient without washing DMSO, which may exacerbate patient's condition or provoke other medical conditions. In our study, we aimed at preparing a non-cytotoxic and xenofree cryopreservation protocol i.e., without DMSO and FBS. We used sugar trehalose in combination with reversible electroporation. Trehalose acts as a cryoprotectant and is present in nature in many extremophilic organisms, especially low temperatures or a dry environment exposed organisms. Numerous studies have shown that for successful cryopreservation trehalose must be present on both sides of the cell membrane, i.e. inside and outside of the cell. However, trehalose is membrane impermeable molecule. Researchers tried to introduce trehalose into the cell in different ways. In our study, we introduced trehalose into the cells by a relatively simple method using electroporation. Electroporation is achieved by delivery of an electrical pulse to the cell, which temporarily increases permeability of the cell membrane and enables the influx of otherwise impermeable trehalose. In our study trehalose was successfully introduced by electroporation into ASC and UC-MSC cells. Electroporation parameters and optimal trehalose concentration to provide sufficiently high cell viability after cryopreservation were determined. To ensure a sufficiently high cell membrane permeability while preserving cells viable, 1.5 kV/cm strength of electric field was determined as optimal. Cells were then cryopreserved at various trehalose concentrations and at least 250 mM extracellular trehalose was determined to be needed for successful cell cryopreservation, where comparable results with standard freezing protocol with 10% DMSO were obtained. Interestingly, only about 10% lower viability after cryopreservation was achieved using non-electroporated cells in comparison to electroporated cells in the presence of 250 mM trehalose, which was not statistically significant ($P = 0,16$ and $P = 0,15$ at ASC and UC-MSC, respectively). However higher differences, about 60%, between electroporated and non-electroporated cells were achieved in co-study. Intracellular trehalose concentration in non-electroporated and electroporated cells was determined before and after cryopreservation. About 40–60 mM intracellular trehalose was determined after electroporation, which increased to about 60–80 mM after cryopreservation. Trehalose was introduced into the cells during phase transition of cell membrane at freezing /thawing and successfully protected the cells. Higher trehalose uptake was achieved by cell incubation in trehalose at higher temperatures (25 or 37 °C) than at low temperature (4 °C) prior freezing. Cell morphology, differentiation properties, gene expression of stress response proteins and immunomodulatory ability were furthermore tested to ensure that trehalose, electroporation or cryopreservation have no adverse impact on functional properties of the cell. We found that trehalose, electroporation, or cell

cryopreservation did not affect cell morphology and differentiation abilities. All treated cells were successfully differentiated into adipogenic and osteogenic lineage. When testing gene expression of stress response proteins, it was observed that electroporation and cryopreservation did not significantly affect expression of antiapoptotic genes *bcl2* and *tp53*, while the gene expression of stress gene *hspb2* did not change between different tested protocols. However, electroporation and cryopreservation had a strong influence on *sod2* gene expression, which is responsible for preventing oxidative stress in the cells. After comparing the expression of *sod2* after different protocols, it was found that cryopreservation with DMSO causes less oxidative stress to the cells compared to electroporated or even non-electroporated cells. Gene expression of heat shock *hspala*, however, varies between different cell types and tested parameters. The expression of *hspala* was time-dependent and was the highest for ASCs after thawing non-electroporated cells, slightly lower for electroporated cells, and the lowest for DMSO cryopreserved cells. Gene expression of *hspala* for UC-MSCs only after 12 hours after thawing showed a slight increase for electroporated cells. To established inflammatory environment for immunomodulatory response of ASCs and UC-MSCs, cells were activated by cytokines $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$. Upon activation, MSCs express various bioactive molecules capable of immunomodulation (IDO, TSG6, $\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL10, IL6). Higher gene expression of *ido* and *tsg6* was obtained for electroporated and non-electroporated cells after cryopreservation in comparison to cells cryopreserved with DMSO. These are encouraging results, since MSCs cryopreserved with DMSO show impaired immunomodulatory properties after thawing, which presumably may affect the quality of freshly thawed cell product for treatment. Expression of other genes, with the exception of *il10*, did not significantly differ for different cryopreservation protocols. Finally, umbilical cord tissue was cryopreserved using the same cryopreservation protocol. The hypothesis that increased tissue permeability achieved with electroporation will enable more even and efficient trehalose distribution was not confirmed, most likely due to the gelatinous structure of the umbilical cord. The same parameters of electroporation and trehalose concentration for cell solution cryopreservation are not effective enough for tissue cryopreservation, hence further research is needed. However, umbilical cord tissue was successfully cryopreserved by using 10% DMSO.

8 VIRI

- Abazari A., Meimetis L. G., Budin G., Bale S. S., Weissleder R., Toner M. 2015. Engineered trehalose permeable to mammalian cells. *PLoS One*, 10, 6: e013032, doi: 10.1371/journal.pone.0130323: 16 str.
- Akhoondi M., Oldenhof H., Sieme H., Wolkers W. F. 2012. Freezing-induced cellular and membrane dehydration in the presence of cryoprotective agents. *Molecular Membrane Biology*, 29, 6: 197–206
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York, Garland Science: 1616 str.
- André F., Mir L. M. 2004. DNA electrotransfer: Its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Therapy*, 11: S33–S42
- Arutyunyan I., Fatkhudinov T., Sukhikh G. 2018. Umbilical cord tissue cryopreservation: a short review. *Stem Cell Research and Therapy*, 9, 1: 236, doi:10.1186/s13287-018-0992-0: 7 str.
- Asgar W., El Assal R., Shafiee H., Anchan R. M., Demirci U. 2014. Preserving human cells for regenerative, reproductive, and transfusion medicine. *Biotechnology Journal*, 9, 7: 895–903
- Awan M., Buriak I., Fleck R., Fuller B., Goltsev A., Kerby J., Lowdell M., Mericka P., Petrenko A., Petrenko Y., Rogulska O., Stolzing A., Stacey G. N. 2020. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative medicine*, 15, 3: 1463–1491
- Badowski M., Muise A., Harris D. T. 2014. Mixed effects of long-term frozen storage on cord tissue stem cells. *Cytotherapy*, 16, 9: 1313–1321
- Baust J. M., Campbell L. H., Harbell J. W. 2017. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 53, 10: 855–871
- Beattie G. M., Crowe J. H., Lopez A. D., Crulli V., Ricordi C., Hayek A. 1997. Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage. *Diabetes*, 46: 519–523
- Bedford P., Jy J., Collins L., Keizer S. 2018. Considering cell therapy product “good manufacturing practice” status. *Frontiers in Medicine*, 5: 118, doi: 10.3389/fmed.2018.00118: 4 str.
- Benaroudj N., Lee D. L., Goldberg A. L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 24261–24267
- Benga, G. 2009. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life*, 61: 112–133

- Berendsen T. A., Bruinsma B. G., Puts C. F., Saeidi N., Usta O. B., Uygun B. E., Izamis M. L., Toner M., Yarmush M. L., Uygun K. 2014. Supercooling enables long-term transplantation survival following 4 days of liver preservation. *Nature Medicine*, 20, 7: 790–793
- Bernardo M. E., Fibbe W. E. 2013. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 13: 392–402
- Bischof J. C., Diller K. R. 2018. From nanowarming to thermoregulation: new multiscale applications of bioheat transfer. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 20: 301–327
- Bissoyi A., Kumar A., Rizvanov A., Nesmelov A., Gusev O., Patra P. K., Bit A. 2016. Recent advances and future direction in lyophilisation and desiccation of mesenchymal stem cells. *Stem cells international*, 2016: 3604203, doi: 10.1155/2016/3604203: 9 str.
- Bonnafoos P., Vernhes M., Teissié J., Gabriel B. 1999. The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electroporation of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1461, 1: 123–134
- Boyt D. T., Boland L. K., Burand A. J. Jr., Brown A. J., Ankrum J. A. 2020. Dose and duration of interferon γ pre-licensing interact with donor characteristics to influence the expression and function of indoleamine-2,3-dioxygenase in mesenchymal stromal cells. *Journal of the Royal Society Interface*, 17, 167: 20190815, doi: 10.1098/rsif.2019.0815: 10 str.
- Brown C., McKee C., Bakshi S., Walker K., Hakman E., Halassy S., Svinarich D., Dodds R., Govind C. K., Chaudhry G. R. 2019. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 13, 9: 1738–1755
- Brockbank K. G. M., Campbell L. H., Greene E. D., Brockbank M. C. G., Duman J. G. 2010. Lessons from nature for preservation of mammalian cells, tissues, and organs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 47, 3: 210–217
- Bruinsma B. G., Berendsen T. A., Izamis M. L., Yeh H., Yarmush M. L., Uygun K. 2015. Supercooling preservation and transplantation of the rat liver. *Nature Protocols*, 10, 3: 484–494
- Buchanan S. S., Gross S. A., Acker J. P., Toner M., Carpenter J. F., Pyatt D. W. 2004. Cryopreservation of stem cells using trehalose: evaluation of the method using a human hematopoietic cell line. *Stem Cells and Development*, 13, 3: 295–305
- Burja B., Barlič A., Erman A., Mrak-Poljšak K., Tomšič M., Sodin-Semrl S., Lakota K. 2020. Human mesenchymal stromal cells from different tissues exhibit unique responses to different inflammatory stimuli. *Current Research in Translational Medicine*, 68, 4: 217–224.

- Campbell L. H., Brockbank K. G. 2011. Comparison of electroporation and Chariot™ for delivery of β -galactosidase into mammalian cells: strategies to use trehalose in cell preservation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 47, 3: 195–199
- Campbell L. H., Brockbank K. G. 2012. Culturing with trehalose produces viable endothelial cells after cryopreservation. *Cryobiology*, 64, 3: 240–244
- Caplan A. I. 1988. Biomaterials and bone repair. *Biomaterials*, 87: 15–24
- Caplan A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9: 641–650
- Caplan A. I., Dennis J. E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98: 1076–1084
- Caplan A. I. 2010. What's in a name? *Tissue Engineering Part A*, 16: 2415–2417
- Caplan A. I., Correa D. 2011. The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 9: 11–15
- Caplan A. I. 2015. Adult mesenchymal stem cells: When, where, and how. *Stem Cells International*, 2015: 628767, doi: 10.1155/2015/628767: 6 str.
- Caplan A. I. 2017. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translation Medicine*, 6, 6: 1445–1451
- Chang D. C., Chassy B. M., Saunders J. A., Sowers A. E. 1992. Guide to electroporation and electrofusion. 1st ed. San Diego, Academic Press: 569 str.
- Chatgililoglu A., Rossi M., Alviano F., Poggi P., Zannini C., Marchionni C., Ricci F., Tazzari P. L., Taglioli V., Calder P. C., Bonsi L. 2017. Restored *in vivo*-like membrane lipidomics positively influence *in vitro* features of cultured mesenchymal stromal/stem cells derived from human placenta. *Stem Cell Research & Therapy*, 8, 1: 31, doi: 10.1186/s13287-017-0487-4: 11 str.
- Chen F., Nakamura T., Wada H. 2004. Development of new organ preservation solutions in Kyoto University. *Yonsei Medical Journal*, 45: 1107–1114
- Chen F., Zhang W., Wu W., Jin Y., Cen L., Kretlow J. D., Gao W., Dai Z., Wang J., Zhou G., Liu W., Cui L., Cao Y. 2011. Cryopreservation of tissue-engineered epithelial sheets in trehalose. *Biomaterials*, 32, 33: 8426–8435
- Chen S. U., Yang Y. S. 2009. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 48, 1: 15–22
- Chinnadurai R., Copland I. B., Garcia M. A., Petersen C. T., Lewis C. N., Waller E. K., Kirk A. D., Galipeau J. 2016. Cryopreserved mesenchymal stromal cells are susceptible to T-cell mediated apoptosis which is partly rescued by IFN γ licensing. *Stem Cells*, 34, 9: 2429–2442

- Choi W., Yum S., Lee S., Lee W., Lee J., Kim S., Koo O., Lee B., Jang G. 2014. Disruption of exogenous eGFP gene using RNA-guided endonuclease in bovine transgenic somatic cells. *Zygote*, 26: 1–8
- Chu D. T., Nguyen Thi Phuong T., Tien N., Tran D. K., Minh L. B., Thanh V. V., Gia Anh P., Pham V. H., Thi Nga V. 2019. Adipose tissue stem cells for therapy: an update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application. *Journal of clinical medicine*, 8, 7: 917, doi: 10.3390/jcm8070917: 19 str.
- Colaco C. A. L. S., Roser B. 1994. Trehalose – A multifunctional additive for food preservation. In: *Food Packaging and Preservation*. Mathlouthi M. (ed.), Boston, Springer: 123–140
- Costanzo J. P., Lee R. E. 2013. Avoidance and tolerance of freezing in ectothermic vertebrates, *Journal of Experimental Biology*, 216: 1961–1967
- Couzin J. 2004. Huntington's disease. Unorthodox clinical trials meld science and care. *Science*, 304: 816–817
- Crowe J. H., Crowe L. M., Carpenter J. F., Rudolph A. S., Wistrom C. A., Spargo B. J., Anchordoguy T. J. 1988. Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 947, 2: 367–384
- Crowe J. H., Crowe L. M., Hoekstra F. A. 1989. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1: 77–91
- Crowe J. H., Crowe L. M. 2000. Preservation of mammalian cells: learning nature's tricks. *Nature Biotechnology*, 18, 2: 145–146
- Crowe J. H., Crowe L. M., Oliver A. E., Tsvetkova N., Wolkers W., Tablin F. 2001. The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43: 89–105
- Crowe J. H., Crowe L. M., Wolkers W. F., Oliver A. E., Ma X., Auh J. H., Tang M., Zhu S., Norris J., Tablin F. 2005. Stabilization of dry mammalian cells: lessons from nature. *Integrative and Comparative Biology*, 45, 5: 810–820
- Cui X. D., Gao D. Y., Fink B. F., Vasconez H. C., Pu L. L. 2007. Cryopreservation of human adipose tissues. *Cryobiology*, 55, 3: 269–278
- Česen Mazič M., Girandon L., Knežević M., Avčin S. L., Jazbec J. 2018. Treatment of severe steroid-refractory acute-graft-vs.-host disease with mesenchymal stem cells-single center experience. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6: 93, doi: 10.3389/fbioe.2018.00093: 6 str.
- De Santis L., Coticchio G. 2011. Theoretical and experimental basis of slow freezing. *Reproductive BioMedicine Online*, 22: 125–132
- De Witte S. F. H., Merino A. M., Franquesa M., Strini T., van Zoggel J.A. A., Korevaar S. S., Luk F., Gargasha M., O'Flynn L., Roy D., Elliman S. J., Newsome P. N., Baan C. C.,

- Hoogduijn M. J. 2017. Cytokine treatment optimises the immunotherapeutic effects of umbilical cord-derived MSC for treatment of inflammatory liver disease. *Stem Cell Research and Therapy*, 8, 1: 140, doi: 10.1186/s13287-017-0590-6: 12 str.
- De Wolf C., van de Bovenkamp M., Hoefnagel M. 2017. Regulatory perspective on *in vitro* potency assays for human mesenchymal stromal cells used in immunotherapy. *Cytotherapy*, 19, 7: 784–797
- Delemotte L., Tarek M. 2012. Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation. *Journal of Membrane Biology*, 245: 531–543
- Dermol-Černe J., Miklavčič D., Reberšek M., Mekuč P., Bardet S. M., Burke R., Arnaud-Cormos D., Leveque P., O'Connor R. 2018. Plasma membrane depolarization and permeabilization due to electric pulses in cell lines of different excitability. *Bioelectrochemistry*, 122: 103–114
- Desrosiers P., Légaré C., Leclerc P., Sullivan R. 2006. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertility and Sterility*, 85: 1744–1752
- Ding Y., Xu L., Jovanovic B. D., Helenowski I. B., Kelly D. L., Catalona W. J., Yang X. J., Pins M., Bergan R. C. 2007. The methodology used to measure differential gene expression affects the outcome. *Journal of Biomolecular Techniques*, 18, 5: 321–330
- Dluska E., Metera A., Markowska-Radomska A., Tudek B. 2019. Effective cryopreservation and recovery of living cells encapsulated in multiple emulsions. *Biopreservation and Biobanking*, 17, 5: 468–476
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 4: 315–317
- Dovgan B., Dermol J., Barlič A., Knežević M., Miklavčič D. 2015. Cryopreservation of human umbilical stem cells in combination with trehalose and reversible electroporation. 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies. *IFMBE Proceedings*, 53: 307–310
- Dovgan B., Barlič A., Knežević M., Miklavčič D. 2017. Cryopreservation of human adipose-derived stem cells in combination with trehalose and reversible electroporation. *Journal of Membrane Biology*, 250, 1: 1–9
- Du T., Chao L., Zhao S., Chi L., Li D., Shen Y., Shi Q., Deng X. 2015. Successful cryopreservation of whole sheep ovary by using DMSO-free cryoprotectant. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32, 8: 1267–1275
- Dulugiac M., Moldovan L., Zarnescu O. 2015. Comparative studies of mesenchymal stem cells derived from different cord tissue compartments - the influence of cryopreservation and growth media. *Placenta*, 36, 10: 1192–1203

- Dymek K., Dejmeek P., Galindo F. G. 2014. Influence of pulsed electric field protocols on the reversible permeabilization of rucola leaves. *Food and Bioprocess Technology*, 7: 761–773
- Elbein A. D. 1974. The metabolism of alpha,alpha-trehalose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 30: 227–256
- Eroglu A., Russo M. J., Bieganski R., Fowler A., Cheley S., Bayley H., Toner M. 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 18, 2: 163–167
- Eroglu A., Bailey S. E., Toner M., Toth T. L. 2009. Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. *Biology of Reproduction*, 80, 1: 70–78
- Everatt M. J., Convey P., Bale J. S., Worland M. R., Hayward S. A. L. 2015. Responses of invertebrates to temperature and water stress: a polar perspective. *Journal of Thermal Biology*, 54: 118–132
- Fahy G. M., Wowk B. 2015. Principles of cryopreservation by vitrification. *Methods in Molecular Biology*, 1257: 21–82
- Fang B., Song Y., Lin Q., Zhang Y., Cao Y., Zhao R.C., Ma Y. 2007. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.host disease in two children. *Pediatric Transplantation*, 11, 7: 814–817
- Fong C. Y., Subramanian A., Biswas A., Bongso A. 2016. Freezing of fresh Wharton's jelly from human umbilical cords yields high post-thaw mesenchymal stem cell numbers for cell-based therapies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117, 4: 815–827
- Forjanič T., Markelc B., Marčan M., Bellard E., Couillaud F., Golzio M., Miklavčič D. 2019. Electroporation-induced stress response and its effect on gene electrotransfer efficacy: *in vivo* imaging and numerical modeling. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 66, 9: 2671–2683
- Fowler A., Toner M. 2006. Cryo-injury and biopreservation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066: 119–135
- François M., Copland I. B., Yuan S., Romieu-Mourez R., Waller E. K., Galipeau J. 2012. Cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunosuppressive properties as a result of heat-shock response and impaired interferon- γ licensing. *Cytotherapy*, 14, 2: 147–152
- Friedman J. M., Halaas J. L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395: 763–770
- Fry L. J., Querol S., Gomez S. G., McArdle S., Rees R., Madrigal J. A. 2015. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation. *Vox sanguinis*, 109, 2: 181–190

- Fulda S., Gorman A. M., Hori O., Samali A. 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 214074, doi: 10.1155/2010/214074: 32 str.
- Gabriel B., Teissié J. 1994. Generation of reactive-oxygen species induced by electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability. *European Journal of Biochemistry*, 223, 1: 25–33
- Galipeau J., Krampera M., Barrett J., Dazzi F., Deans R. J., DeBruijn J., Dominici M., Fibbe W. E., Gee A. P., Gimble J. M., Hematti P., Koh M. B., LeBlanc K., Martin I., McNiece I. K., Mendicino M., Oh S., Ortiz L., Phinney D. G., Planat V., Shi Y., Stroncek D. F., Viswanathan S., Weiss D. J., Sensebe L. 2016. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy*, 18, 2: 151–159
- Gao L., Zhang Y., Hu B., Liu J., Kong P., Lou S., Su Y., Yang T., Li H., Liu Y., Zhang C., Gao L., Zhu L., Wen Q., Wang P., Chen X., Zhong J., Zhang X. 2016. Phase II multicenter, randomized, double-blind controlled study of efficacy and safety of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in the prophylaxis of chronic graft-versus-host disease after HLA-haploidentical stem-cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, 34, 24: 2843–2850
- Garg A. K., Kim J. K., Owens T. G., Ranwala A. P., Choi Y. D., Kochian L. V., Wu R. J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 15898–15903
- Garvey C. J., Lenné T., Koster K. L., Kent B., Bryant G. 2013. Phospholipid membrane protection by sugar molecules during dehydration – insights into molecular mechanisms using scattering techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 8148–8163
- Geboers B., Scheffer H. J., Graybill P. M., Ruarus A. H., Nieuwenhuizen S., Puijk R. S., van den Tol P. M., Davalos R. V., Rubinsky B., de Gruijl T. D., Miklavčič D., Meijerink M. R. 2020. High-voltage electrical pulses in oncology: irreversible electroporation, electrochemotherapy, gene electrotransfer, electrofusion, and electroimmunotherapy. *Radiology*, 295: 254–272
- Gimeno-Alcaniz J. V., Prez-Ortln J. E., Matallana E. 1999. Differential pattern of trehalose accumulation in wine yeast strains during the microvinification process. *Biotechnology Letters*, 21: 271–274
- Giwa S., Lewis J. K., Alvarez L., Langer R., Roth A. E., Church G. M., Markmann J. F., Sachs D. H., Chandraker A., Wertheim J. A., Rothblatt M., Boyden E. S., Eidbo E., Lee W. P. A., Pomahac B., Brandacher G., Weinstock D. M., Elliott G., Nelson D., Acker J. P., Uygun K., Schmalz B., Weegman B. P., Tocchio A., Fahy G. M., Storey K. B., Rubinsky B., Bischof J., Elliott J. A. W., Woodruff T. K., Morris G. J., Demirci U., Brockbank K. G. M., Woods E. J., Ben R. N., Baust J. G., Gao D., Fuller B., Rabin Y., Kravitz D. C., Taylor M. J., Toner M. 2017. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nature Biotechnology*, 35, 6: 530–542

- Golchin A., Seyedjafari E., Ardeshiryajimi A. 2020. Mesenchymal stem cell therapy for COVID-19: Present or Future. *Stem cell reviews and reports*, 16, 3: 427–433
- Grégoire C., Ritacco C., Hannon M., Seidel L., Delens L., Belle L., Dubois S., Vériter S., Lechanteur C., Briquet A., Servais S., Ehx G., Beguin Y., Baron F.. 2019. Comparison of mesenchymal stromal cells from different origins for the treatment of graft-vs.-host-disease in a humanized mouse model. *Frontiers in Immunology*, 10: 619, doi: 10.3389/fimmu.2019.00619: 16 str.
- Grigg A., Hoyt R., Szer J. 2000. Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplantation*, 25: 1285–1287
- Guo N., Puhlev I., Brown D. R., Mansbridge J., Levine F. 2000. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology*, 18, 2: 168–171
- Gurtovenko A. A., Anwar J. 2007. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *Journal of Physical Chemistry B*, 111: 10453–10460
- Haberl S., Miklavčič D., Serša G., Frey W., Rubinsky B. 2013. Cell membrane electroporation – Part 2: The applications. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 29, 1: 29–37
- Hass R., Kasper C., Böhm S., Jacobs R. 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 14: 9–12
- Haynesworth S. E., Goshima J., Goldberg V. M., Caplan A. 1992. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13: 81–88
- Hernández J. L., Coll T., Ciudad C. J. 2004. A highly efficient electroporation method for the transfection of endothelial cells. *Angiogenesis*, 7, 3: 235–241
- Higashiyama T. 2002. Novel functions and applications of trehalose. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 7: 1263–1269
- Higman M. A., Port J. D., Beauchamp N. J., Chen A.R. Jr. 2000. Reversible leukoencephalopathy associated with re-infusion of DMSO preserved stem cells. *Bone Marrow Transplantation*, 26: 797–800
- Horwitz E. M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Deans R. J., Krause D. S., Keating A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7: 393–395
- Hu L., Hu J., Zhao J., Liu J., Ouyang W., Yang C., Gong N., Du L., Khanal A., Chen L. 2013. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *BioMed Research International*, 2013: 438243, doi: 10.1155/2013/438243: 12 str.

- Hubel A., Cravalho E., Nunner B., Körber C. 1992. Survival of directionally solidified B-lymphoblasts under various crystal growth conditions. *Cryobiology*, 29, 2: 183–119
- Hunt C. J. 2007. The banking and cryopreservation of human embryonic stem cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 34: 293, doi: 10.1159/000104458: 12 str.
- Ikebe C., Suzuki K. 2014. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols, *BioMed research international*, 2014, 951512, doi: 10.1155/2014/951512: 11 str.
- Júnior A. M., Arrais C. A., Saboya R., Velasques R. D., Junqueira P. L., Dulley F. L. 2008. Neurotoxicity associated with dimethylsulfoxide-preserved hematopoietic progenitor cell infusion. *Bone Marrow Transplantation*, 41, 1: 95–96
- Kabat M., Bobkov I., Kumar S., Grumet M. 2020. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: Is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem Cells Translational Medicine*, 9: 17–27
- Kandušer M., Miklavčič D. 2008. Electroporation in biological cell and tissue: an overview. *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials Food Engineering Series*: 1–37
- Kandušer M., Šentjerc M., Miklavčič D. 2008. The temperature effect during pulse application on cell membrane fluidity and permeabilization. *Bioelectrochemistry*, 74: 52–57
- Kanias T., Acker J. P. 2006. Mammalian cell desiccation: facing the challenges. *Cell Preservation Technology*, 4, 4: 253–277
- Karlsson O. M. J., Toner M. 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*: 243–256
- Kay A. G., Hoyland J. A., Rooney P., Kearney J. N., Pegg D. E. 2015. A liquidus tracking approach to the cryopreservation of human cartilage allografts. *Cryobiology*, 71, 1: 77–84
- Kilpinen L., Tigistu-Sahle F., Oja S., Greco D., Parmar A., Saavalainen P., Nikkilä J., Korhonen M., Lehenkari P., Käkelä R., Laitinen S. 2013. Aging bone marrow mesenchymal stromal cells have altered membrane glycerophospholipid composition and functionality. *Journal of Lipid Research*, 54, 3: 622–635
- Kinosita K. Jr., Tsong T. Y. 1977. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature*, 5619: 438–441
- Komes D., Lovrić T., Kovačević-Ganić T., Gracin L. 2003. Study of trehalose addition on aroma retention in dehydrated strawberry puree. *Food Technology and Biotechnology*, 41: 111–119
- Konov K. B., Leonov D. V., Isaev N. P., Fedotov K. Y., Voronkova V. K., Dzuba S. A. 2015. Membrane-sugar interactions probed by pulsed electron paramagnetic resonance of spin labels. *Journal of Physical Chemistry*, 119, 32: 10261–10266

- Kos S., Lopes A., Preat V., Cemazar M., Lamprecht-Tratar U., Ucakar B., Vanvarenberg K., Sersa G., Vandermeulen G. 2019. Intradermal DNA vaccination combined with dual CTLA-4 and PD-1 blockade provides robust tumor immunity in murine melanoma. *PLoS One*, 14, 5: e0217762, doi: 10.1371/journal.pone.0217762: 18 str.
- Koster K. L., Bryant G. 2005. Dehydration in model membranes and protoplasts: contrasting effects at low, intermediate and high hydrations. *Cold Hardiness in Plants: Molecular Genetics, Cell Biology and Physiology*. Oxon, CAB International: 219–234
- Kotnik T., Bobanovič F., Miklavčič D. 1997. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields - a theoretical analysis. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43: 285–291
- Kotnik T., Miklavčič D. 2006. Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophysical Journal*, 90: 480–491
- Kotnik T., Kramar P., Pucihar G., Miklavčič D., Tarek M. 2012. Cell membrane electroporation – part 1: The phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 28, 5: 14–23
- Kotnik T., Rems L., Tarek M., Miklavčič D. 2019. Membrane electroporation and electropermeabilization: Mechanisms and models. *Annual Review of Biophysics*, 48: 63–91
- Krampera M. 2011. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia*, 25, 9: 1408–1414
- Kui L., Chan G. C., Lee P. P. 2017. TSG-6 Downregulates IFN- α and TNF- α expression by suppressing IRF7 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cells. *Mediators of Inflammation*, 2017: 7462945, doi: 10.1155/2017/7462945: 12 str.
- Larson D. J., Middle L., Vu H., Zhang W., Serianni A. S., Duman J., Barnes B. M. 2014. Wood frog adaptations to overwintering in Alaska: New limits to freezing tolerance. *Journal of Experimental Biology*, 217, 12: 2193–2200
- Le Blanc K., Mougiakakos D. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12: 383–396
- Lebar A. M., Serša G., Čemažar M., Miklavčič D. 1998. Elektroporacija / Electroporation *Medicinski razgledi*, 37: 339–354
- Lee Y. A., Kim Y. H., Kim B. J., Kim B. G., Kim K. J., Auh J. H., Schmidt J. A., Ryu B. Y. 2013. Cryopreservation in trehalose preserves functional capacity of murine spermatogonial stem cells. *PLoS One*, 8, 1: e54889, doi: 10.1371/journal.pone.0054889: 9 str.
- Lee R. H., Yu J. M., Foskett A. M., Peltier G., Reneau J. C., Bazhanov N., Oh J. Y., Prockop D. J. 2014a. TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation *in vivo*. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111, 47: 16766–16771
- Lee Y. A., Kim Y. H., Ha S. J., Kim K. J., Kim B. J., Kim B. G., Choi S. H., Kim I. C., Schmidt J. A., Ryu B. Y. 2014b. Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalose. *Journal of Animal Science*, 92, 3: 984–995
- Leibo S., Pool T. B. 2011. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertility and Sterility*, 96: 269–276
- Lendeckel S., Jödicke A., Christophis P., Heidinger K., Wolff J., Fraser J.K., Hedrick M.H., Berthold L., Howaldt H.P. 2004. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 32, 6: 370–373
- Leyendecker A. Jr., Pinheiro C. C. G., Amano M. T., Bueno D. F. 2018. The use of human mesenchymal stem cells as therapeutic agents for the *in vivo* treatment of immune-related diseases: a systematic review. *Frontiers in Immunology*, 9: 2056, doi: 10.3389/fimmu.2018.02056: 50 str.
- Lovelock J. 1953. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 10: 414–426
- Lovelock J. E., Bishop M. W. H. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183: 1394–1395
- Lowe C. H., Lardner P. J., Halpern E. A. 1971. Supercooling in reptiles and other vertebrates. comparative biochemistry and physiology part A: Molecular and Integrative Physiology, 39, 1: 125–135
- Lu H. F., Narayanan K., Lim S. X., Gao S., Leong M. F., Wan A. C. 2012. A 3D microfibrinous scaffold for long-term human pluripotent stem cell self-renewal under chemically defined conditions. *Biomaterials*, 33, 8: 2419–2430
- Lucena E., Bernal D. P., Lucena C., Rojas A., Moran A., Lucena A. 2006. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertility and Sterility*, 85: 108–111
- Lyu C., Nastase G., Ukpai G., Serban A., Rubinsky B. 2017. A comparison of freezing-damage during isochoric and isobaric freezing of the potato. *PeerJ*, 5: e3322, doi: 10.7717/peerj.3322: 15 str.
- Ma J., Wu J., Han L., Jiang X., Yan L., Hao J., Wang H. 2019. Comparative analysis of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane, umbilical cord, and chorionic plate under serum-free condition. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, 1: 19, doi: 10.1186/s13287-018-1104-x: 13 str.
- Manuchehrabadi N., Gao Z., Zhang J., Ring H. L., Shao Q., Liu F., McDermott M., Fok A., Rabin Y., Brockbank K. G., Garwood M., Haynes C. L., Bischof J. C. 2017. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles. *Science Translational Medicine*, 9, 379: eaah4586, doi: 10.1126/scitranslmed.aah4586: 24 str.

- Marques L. S., Fossati A. A. N., Rodrigues R. B., Da Rosa H. T., Izaguirry A. P., Ramalho J. B., Moreira J. C. F., Santos F. W., Zhang T., Streit D. P. Jr. 2019. Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue. *Scientific Reports*, 9, 1: 15353, doi: 10.1038/s41598-019-51696-7: 11 str.
- Marquez-Curtis L. A., Janowska-Wieczorek A., McGann L. E., Elliott J. A. 2015. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*, 71, 2: 181–197
- Maslova O., Novak M., Kruzliak P. 2015. Umbilical cord tissue-derived cells as therapeutic agents. *Stem Cells International*, 2015: 150609, doi: 10.1155/2015/150609: 10 str.
- Matsuo T. 2001. Trehalose protects corneal epithelial cells from death by drying. *British Journal of Ophthalmology*, 85: 610–612
- Maurel C. 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 399–429
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 247, 3: C125–C142
- McElreavey K. D., Irvine A. I., Ennis K. T., McLean W. H. 1991. Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochemical Society Transactions*, 19, 1: 29S
- Meirelles Lda S., Fontes A. M., Covas D. T., Caplan A. I. 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20, 5-6: 419–427
- Miana V. V., González E. A. P. 2018. Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedalscience*, 12: 822, doi: 10.3332/ecancer.2018.822: 14 str.
- Miklavčič D., Mali B., Kos B., Heller R., Serša G. 2014. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *BioMedical Engineering Online*, 13: 29, doi: 10.1186/1475-925X-13-29: 20 str.
- Miklavčič D., Davalos R. V. 2015. Electrochemotherapy (ECT) and irreversible electroporation (IRE) – advanced techniques for treating deep-seated tumors based on electroporation. *BioMedical Engineering Online*, 14 (Suppl. 3): I1, doi: 10.1186/1475-925X-14-S3-I1: 7 str.
- Mikus H., Miller A., Nastase G., Serban A., Shapira M., Rubinsky B. 2016. The nematode *Caenorhabditis elegans* survives subfreezing temperatures in an isochoric system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 477, 3: 401–405
- Milner C. M., Day A.J. 2003. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *Journal of Cell Science*, 116: 1863–1873
- Mitchell R., Wagner J. E., Brunstein C. G., Cao Q., McKenna D. H., Lund, T. C., Verneris, M. R. 2015. Impact of long-term cryopreservation on single umbilical cord blood

- transplantation outcomes. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 21, 1: 50–54
- Mlakar V., Todorović V., Čemažar M., Glavač D., Serša G. 2009. Electric pulses used in electrochemotherapy and electrogene therapy do not significantly change the expression profile of genes involved in the development of cancer in malignant melanoma cells. *BMC Cancer*, 9: 299, doi:10.1186/1471-2407-9-299: 8 str.
- Mohamed-ali V., Pinkney J. H., Coppack S. W. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *International Journal of Obesity Related Metabolism Disorder*, 22: 1145–1158
- Mohr J. C., de Pablo J. J., Palecek S. P. 2006. Electroporation of human embryonic stem cells: small and macromolecule loading and DNA transfection. *Biotechnology Progress*, 22: 825–834
- Moll G., Alm J. J., Davies L. C., von Bahr L., Heldring N., Stenbeck-Funke L., Hamad O. A., Hinsch R., Ignatowicz L., Locke M., Lönnies H., Lambris J. D., Teramura Y., Nilsson-Ekdahl K., Nilsson B., Le Blanc K. 2014. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells*, 32, 9: 2430–2442
- Morris C., de Wreede L., Scholten M., Brand R., van Biezen A., Sureda A., Dickmeiss E., Trneny M., Apperley J., Chiusolo P., van Imhoff G. W., Lenhoff S., Martinelli G., Hentrich M., Pabst T., Onida F., Quinn M., Kroger N., de Witte T., Ruutu T. 2014. Should the standard dimethyl sulfoxide concentration be reduced? Results of a European Group for Blood and Marrow Transplantation prospective noninterventional study on usage and side effects of dimethyl sulfoxide. *Transfusion*, 54, 10: 2514–2522
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 1–2: 55–63
- Murphy M. B., Moncivais K., Caplan A. I. 2013. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 45, 11: e54, doi: 10.1038/emm.2013.94: 16 str.
- Mutsenko V., Barlič A., Pezić T., Dermol-Černe J., Dovgan B., Sydykov B., Wolkers W. F., Katkov I.I., Glasmacher B., Miklavčič D., Gryshkov O. 2019. Me2SO and serum-free cryopreservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells using electroporation-assisted delivery of sugars. *Cryobiology*, 91: 104–114
- Nakahara H., Bruder S. P., Goldberg V. M., Caplan A.I. 1990. *In vivo* osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 259: 223–232
- Năstase G., Lyu C., Ukpai G., Şerban A., Rubinsky B. 2017, Isochoric and isobaric freezing of fish muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 485, 2: 279–283

- Neta T., Takada K., Hirasawa M. 2000. Low-cariogenicity of trehalose as a substrate. *Journal of Dentistry*, 28: 571–576
- Neumann E., Rosenheck K. 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *Journal of Membrane Biology*, 10, 3: 279–290
- Neumann E., Sowers A. E., Jordan C.A. 1989. *Electroporation and electrofusion in cell biology*. 1st ed. New York, Plenum press: 436 str.
- Nishizaki Y., Yoshizane C., Toshimori Y., Arai N. 2000. Disaccharide-trehalose inhibits bone resorption in ovariectomized mice. *Nutrition Research*, 20: 653–664
- Noguchi H., Naziruddin B., Onaca N., Jackson A., Shimoda M., Ikemoto T., Fujita Y., Kobayashi N., Levy M. F., Matsumoto S. 2010. Comparison of modified Celsior solution and M-Kyoto solution for pancreas preservation in human islet isolation. *Cell Transplantation*, 6: 751–758
- Nuccitelli R., Lui K., Kreis M., Athos B., Nuccitelli P. 2013. Nanosecond pulsed electric field stimulation of reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells is Ca^{2+} -dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435, 4: 580–585
- Ohtake S., Wang Y. J. 2011. Trehalose: current use and future applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 6: 2020–2053
- Pak J., Lee J. H., Pak N., Pak Y., Park K. S., Jeon J. H., Jeong B. C., Lee S. H. 2018. Cartilage regeneration in humans with adipose tissue-derived stem cells and adipose stromal vascular fraction cells: updated status. *International journal of molecular sciences*, 19, 7: 2146, doi: 10.3390/ijms19072146:18 str.
- Pakhomova O.N., Khorokhorina V. A., Bowman A. M., Rodaitė-Riševičienė R., Saulis G., Xiao S., Pakhomov A. G. 2012. Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527, 1: 55–64
- Pappa K. I., Anagnou N. P. 2009. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regenerative Medicine*, 4, 3: 423–433
- Pataro C., Guerra J. B., Gomes F. C. O., Neves M. J., Pimentel P. F., Rosa C. A. 2002. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 202–208
- Pavlin M., Leben V., Miklavčič D. 2007. Electroporation in dense cell suspension – Theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770: 12–23
- Pegg D. E. 2006. The preservation of tissues for transplantation. *Cell and Tissue Banking*, 7, 4: 349–358
- Phillips J. C. 1979. Topology of covalent non-crystalline solids I: Short-range order in chalcogenide alloys. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 34, 2: 153–181

- Phoon P. Y., Galindo F. G., Vicente A., Deimek P. 2008. Pulsed electric field in combination with vacuum impregnation with trehalose improves the freezing tolerance of spinach leaves. *Journal of Food Engineering*, 88, 1: 144–148
- Pias E. K., Ekshyyan O. Y., Rhoads C. A., Fuseler J., Harrison L., Aw T. Y. 2003. Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 15: 13294–13301
- Pike L. J. 2009. The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl: S323–S328, doi: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800040-JLR200>: 6 str.
- Pilbauerová N., Suchánek J. 2018. Cryopreservation of dental stem cells. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 61, 1: 1–7
- Pirjali T., Azarpira N., Ayatollahi M., Aghdaie M. H., Geramizadeh B., Talai T. 2013. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord Wharton's jelly and amniotic membrane. *International Journal of Organ Transplantation Medicine*, 4, 3: 111–116
- Pittenger M. F., Discher D. E., Péault B. M., Phinney D. G., Hare J. M., Caplan A. I. 2019. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative Medicine*, 4: 22, doi: 10.1038/s41536-019-0083-6: 15 str.
- Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 4172: 666
- Popovic P., Popovic V. 1963. Survival of newborn ground squirrels after supercooling or freezing. *American Journal of Physiology*, 204, 5: 949–952
- Potočnik T., Miklavčič D., Maček Lebar A. 2019. Effect of electroporation and recovery medium pH on cell membrane permeabilization, cell survival and gene transfer efficiency *in vitro*. *Bioelectrochemistry*, 130: 107342, doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107342: 11 str.
- Pu L. L., Cui X., Fink B. F., Cibull M. L., Gao D. 2005. Cryopreservation of adipose tissues: the role of trehalose. *Aesthetic Surgery Journal*, 25, 2: 126–131
- Pu L. L. 2009. Cryopreservation of adipose tissue. *Organogenesis*, 5, 3: 138–142
- Puissant B., Barreau C., Bourin P., Clavel C., Corre J., Bousquet C., Taureau C., Cousin B., Abbal M., Laharrague P., Penicaud L., Casteilla L., Blancher A. 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, 29, 1: 118–129
- Puschmann E., Selden C., Butler S., Fuller B. 2014. Liquidus tracking: controlled rate vitrification for the cryopreservation of larger volumes and tissues. *Cryo Letters*, 35, 4: 345–355
- Rada T., Reis R. L., Gomes M. E. 2009. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering* 15: 113–125

- Rai Y., Pathak R., Kumari N., Sah D. K., Pandey S., Kalra N., Soni R., Dwarakanath B. S., Bhatt A. N. 2018. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports*, 8, 1: 1531, doi: 10.1038/s41598-018-19930-w: 15 str.
- Ramos T. V., Mathew A. J., Thompson M. L., Ehrhardt R. O. 2014. Standardized cryopreservation of human primary cells. *Current protocols in cell biology*, 64: A.3I.1–A.3I.8
- Rao W., Huang H., Wang H., Zhao S., Dumbleton J., Zhao G., He X. 2015. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 8: 5017–5028
- Regmi S., Pathak S., Kim J. O., Yong C. S., Jeong J. H. 2019. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *European Journal of Cell Biology*, 98, 5–8: 151041, doi: 10.1016/j.ejcb.2019.04.002: 19 str.
- Ren G., Su J., Zhang L., Zhao X., Ling W., L'huillie A., Zhang J., Lu Y., Roberts A. I., Ji W., Zhang H., Rabson A. B., Shi Y. 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*, 27, 8: 1954–1962
- Richter M. M., Williams C. T., Lee T. N., Tøien Ø., Florant G. L., Barnes B. M., Buck C. L. 2015. Thermogenic capacity at subzero temperatures: how low can a hibernator go? *Physiological and Biochemical Zoology*, 88, 1: 81–89
- Robinson C. H. 2001. Cold adaptation in arctic and antarctic fungi. *New Phytologist*, 151: 341–353
- Romanov Y. A., Balashova E. E., Volgina N. E., Kabaeva N. V., Dugina T. N., Sukhikh G. T. 2016. Isolation of multipotent mesenchymal stromal cells from cryopreserved human umbilical cord tissue. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 160, 4: 530–534
- Rondinone C. M. 2006. Adipocyte-derived hormones, cytokines and mediators. *Endocrine*, 29: 81–90
- Roy S., Arora S., Kumari P., Ta M. 2014. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 68, 3: 467–472
- Rožman P., Jež M. 2010. Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo) – Pojmovnik. Ljubljana, DCTIS – Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije.
http://www.dctis.si/wp-content/uploads/2014/02/SC_slovarcek_SLO20.pdf (21. avg. 2019)
- Rubinsky B., Perez P. A., Carlson M. E. 2005. The thermodynamic principles of isochoric cryopreservation. *Cryobiology*, 50, 2: 121–138

- Ryden M., Dicker A., Gotherstrom C., Astrom G., Tammik C., Arner P., Le Blanc K. 2003. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311: 391–397
- Sack M., Sigler J., Frenzel S., Eing C., Arnold J., Michelberger T., Frey W., Attmann F., Stukenbrock L., Müller G. 2010. Research on industrialscale electroporation devices fostering the extraction of substances from biological tissue. *Food Engineering Reviews*, 2: 147–156
- Samot J., Moon S., Shao L., Zhang X., Xu F., Song Y., Keles H. O., Matloff L., Markel J., Demirci U. 2011. Blood banking in living droplets. *PLoS One*, 6, 3: e17530, doi: 10.1371/journal.pone.0017530: 6 str.
- Santos N. C., Figueira-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C. 2003. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, 65, 7: 1035–1041
- Santos-Nascimento D., Mosqueira D., Sousa L. M., Teixeira M., Filipe M., Resende T. P., Araújo A. F., Valente M., Almeida J., Martins J. P., Santos J. M., Bárcia R. N., Cruz P., Cruz H., Pinto-do-Ó P. 2014. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem Cell Research and Therapy*, 5, 1: 5, doi: 10.1186/scrt394: 14 str.
- Saulis G. 1997. Pore disappearance in a cell after electroporation: theoretical simulation and comparison with experiments. *Biophysical Journal*, 3: 1299–1309
- Saulis G. 2010. Electroporation of cell membranes: The fundamental effects of pulsed electric fields in food processing. *Food Engineering Reviews*, 2, 2: 52–73
- Saulis G., Saulé R. 2012. Size of the pores created by an electric pulse: microsecond vs millisecond pulses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818, 12: 3032–3039
- Schoenbach K., Beebe S., Buescher E. 2001. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses. *Bioelectromagnetics*, 22, 6: 440–448
- Serša G., Miklavčič D., Čemažar M., Rudolf Z., Pucihar G., Snoj M. 2008. Electrochemotherapy in treatment of tumours. *European Journal of Surgical Oncology*, 34: 232–240
- Sharp D. M., Picken A., Morris T. J., Hewitt C. J., Coopman K., Slater N. K. 2013. Amphipathic polymer-mediated uptake of trehalose for dimethyl sulfoxide-free human cell cryopreservation. *Cryobiology*, 67, 3: 305–311
- Shayanfan S., Chauhan O., Toepfl S., Heinz V. 2013. The interaction of pulsed electric fields and texturizing - antifreezing agents in quality retention of defrosted potato strips. *International Journal of Food Science Technology*, 48: 1289–1295
- Shen C., Yang C., Xu S., Zhao H. 2019. Comparison of osteogenic differentiation capacity in mesenchymal stem cells derived from human amniotic membrane (AM), umbilical

- cord (UC), chorionic membrane (CM), and decidua (DC). *Cell & Bioscience*, 9: 17, doi: 10.1186/s13578-019-0281-3: 11 str.
- Shimazu T., Mori Y., Takahashi A., Tsunoda H., Tojo A., Nagamura-Inoue T. 2015. Serum- and xeno-free cryopreservation of human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source. *Cytotherapy*, 17, 5: 593–600
- Shirakashi R., Köstner C. M., Müller K. J., Kürschner M., Zimmermann U., Sukhorukov V.L. 2002. Intracellular delivery of trehalose into mammalian cells by electropermeabilization. *Journal of Membrane Biology*, 189: 45–54
- Shivakumar S. B., Bharti D., Subbarao R. B., Jang S. J., Park J. S., Ullah I., Park J. K., Byun J. H., Park B. W., Rho G. J. 2016. DMSO- and serum-free cryopreservation of Wharton's jelly tissue isolated from human umbilical cord. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117, 10: 2397–2412
- Skiles M. L., Brown K. S., Tatz W., Swingle K., Brown H. L. 2018. Quantitative analysis of composite umbilical cord tissue health using a standardized explant approach and an assay of metabolic activity. *Cytotherapy*, 20, 4: 564–575
- Song M., Heo J., Chun J. Y., Bae H. S., Kang J. W., Kang H., Cho Y. M., Kim S. W., Shin D. M., Choo M. S. 2014. The paracrine effects of mesenchymal stem cells stimulate the regeneration capacity of endogenous stem cells in the repair of a bladder-outlet-obstruction-induced overactive bladder. *Stem Cells and Development*, 23, 6: 654–663
- Song J. S., Hong K. T., Kim N. M., Jung J. Y., Park H. S., Chun Y. S., Kim S. J. 2019. Cartilage regeneration in osteoarthritic knees treated with distal femoral osteotomy and intra-lesional implantation of allogenic human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells: A report of two cases. *Knee*, 26, 6: 1445–1450
- Stefańska K., Ożegowska K., Hutchings G., Popis M., Moncrieff L., Dompe C., Janowicz K., Pieńkowski W., Gutaj P., Shibli J. A., Prado W. M., Piotrowska-Kempisty H., Mozdziak P., Bruska M., Zabel M., Kempisty B., Nowicki, M. 2020. Human Wharton's jelly-cellular specificity, stemness potency, animal models, and current application in human clinical trials. *Journal of clinical medicine*, 9, 4: 1102, doi: 10.3390/jcm9041102: 22 str.
- Steinman R. M., Mellman I. S., Muller W. A. 1983. Endocytosis and recycling of plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 96: 1–27
- Steponkus P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35: 543–584
- Stewart S., He X. 2019, Intracellular delivery of trehalose for cell banking. *Langmuir*, 35, 23: 7414–7422
- Subramanian A., Fong C. Y., Biswas A., Bongso A. 2015. Comparative characterization of cells from the various compartments of the human umbilical cord shows that the Wharton's jelly compartment provides the best source of clinically utilizable

- mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 10, 6: e0127992, doi: 10.1371/journal.pone.0127992: 25 str.
- Sugrue A., Vaidya V., Witt C., DeSimone C.V., Yasin O., Maor E., Killu A. M., Kapa S., McLeod C. J., Miklavčič D., Asirvatham S. J. 2019. Irreversible electroporation for catheter-based cardiac ablation: a systematic review of the preclinical experience. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*, 55: 251–265
- Swanson J. A., Yirinec B. D., Silverstein S. C. 1985. Phorbol esters and horseradish peroxidase stimulate pinocytosis and redirect the flow of pinocytosed fluid in macrophages. *Journal of Cell Biology*, 100: 851–859
- Syme R., Bewick M., Stewart D., Porter K., Chadderton T., Glück S. 2004. The role of depletion of dimethyl sulfoxide before autografting: on hematologic recovery, side effects, and toxicity. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 10, 2: 135–141
- Takeuchi K., Banno N. 1998. New applications of trehalose and its potential application in cosmetic products. *Flavour and Fragrance Journal*, 7: 39–47
- Tanaka M., Machida Y., Niu S., Ikeda T., Jana N. R., Doi H., Kurosawa M., Nekooki M., Nukina N. 2004. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine*, 10, 2: 148–154
- Tanaka K. 2009. Development of Trehalose and its properties. *Food Industry*, 52, 10: 45–51
- Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, 10: a016295, doi: 10.1101/cshperspect.a016295: 17 str.
- Tarkowski Ł. P., Van Den Ende W. 2015. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1–7
- Taylor M. J., Weegman B. P., Baicu S. C., Giwa S. E. 2019. New approaches to cryopreservation of cells, tissues, and organs. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46, 3: 197–215
- Teissié J., Rols M. P. 1994. Manipulation of the cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 720: 98–109
- Tsong T. Y. 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*, 60: 297–306
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 7: Rresearch0034, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034: 12 str.
- Vasovic L. V., Reich-Slotky R., Goel R. 2018. Chapter 13 - Hematopoietic stem cell collections and cellular therapies. *Clinical Principles of Transfusion Medicine*, 151–167

- Vernier P. T., Levine Z. A., Wu Y. H., Joubert V., Ziegler M. J., Mir L. M., Tieleman D.P. 2009. Electroporating fields target oxidatively damaged areas in the cell membrane. *PLoS One*, 4, 11: e7966, doi: 10.1371/journal.pone.0007966: 8 str.
- Vieira Paladino F., de Moraes Rodrigues J., da Silva A., Goldberg A.C. 2019. The immunomodulatory potential of Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells International*, 2019: 3548917, doi: 10.1155/2019/3548917: 7 str.
- Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W., Ho A.D. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33: 1402–1416
- Wang G., Bunnell B. A., Painter R. G., Quiniones B. C., Tom S., Lanson N. A. Jr., Spees J. L., Bertucci D., Peister A., Weiss D. J., Valentine V. G., Prockop D. J., Kolls J. K. 2005. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1: 186–191
- Wang X., Hua T. C., Sun D. W., Liu B., Yang G., Cao Y. 2007. Cryopreservation of tissue-engineered dermal replacement in Me2SO: Toxicity study and effects of concentration and cooling rates on cell viability. *Cryobiology*, 55, 1: 60–65
- Wang L., Li J., Liu H., Li Y., Fu J., Sun Y., Xu R., Lin H., Wang S., Lv S., Chen L., Zou Z., Li B., Shi M., Zhang Z., Wang F.S. 2013. Pilot study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transfusion in patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1: 85–92
- Wang J., Zhao G., Zhang Z., Xu X., He X. 2016. Magnetic induction heating of superparamagnetic nanoparticles during rewarming augments the recovery of hUCM-MSCs cryopreserved by vitrification. *Acta Biomaterialia*, 33: 264–274
- Weaver J. C., Chizmadzhev Y. A. 1996. Theory of electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41: 135–160
- Weng L., Beauchesne P. R. 2020. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. *Cryobiology*, 94: 9–17
- Wohnhaas C. T., Leparo G. G., Fernandez-Albert F., Kind D., Gantner F., Viollet C., Hildebrandt T., Baum P. 2019. DMSO cryopreservation is the method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing. *Scientific Reports*, 9, 1: 10699, doi: 10.1038/s41598-019-46932-z: 14 str.
- Wolfe J., Bryant G. 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, 39: 103–129
- Wolkers W. F., Walker N. J., Tablin F., Crowe J. H. 2001. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology*, 42, 2: 79–87

- Woods E. J., Perry B. C., Hockema J. J., Larson L., Zhou D., Goebel W. S. 2009. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*, 59, 2: 150–157
- Xi H., Ren F., Zhang X., Li Y., Zhang L., Wen F., Feng T., Zhang X., Niu T., Hu J., Wang P. 2019. Trehalose protects testicular tissue of dairy goat upon cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 54, 12: 1552–1559
- Yang Y., Melzer C., Bucan V., von der Ohe J., Otte A., Hass R. 2016. Conditioned umbilical cord tissue provides a natural three-dimensional storage compartment as *in vitro* stem cell niche for human mesenchymal stroma/stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7: 28, doi: 10.1186/s13287-016-0289-0: 14 str.
- Yarmush M. L., Golberg A., Serša G., Kotnik T., Miklavčič D. 2014. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16: 295–320
- Yong K. W., Pinguang-Murphy B., Xu F., Abas W. A., Choi J. R., Omar S. Z., Azmi M. A., Chua K. H., Wan Safwani W. K. 2015. Phenotypic and functional characterization of long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Scientific reports*, 5, 9596, doi: 10.1038/srep09596: 10 str.
- Yoshizane C., Arai N., Arai C., Yamamoto M., Nishizaki Y., Hanaya T., Arai S., Ikeda M., Kurimoto M. 2000. Trehalose suppresses osteoclast differentiation in ovariectomized mice: Correlation with decreased *in vitro* interleukin-6 production by bone marrow cells. *Nutrition Research*, 20: 1485–1491
- Zachar L., Bačenkova D., Rosocha J. 2016. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of Inflammation Research*, 9: 231–240
- Zeng J., Yin Y., Zhang L., Hu W., Zhang C., Chen W. 2016. A supramolecular gel approach to minimize the neural cell damage during cryopreservation process. *Macromolecular Bioscience*, 16, 3: 363–730
- Zenhausen R., Tobler A., Leoncini L., Hes O. M., Ferrari P. 2000. Fatal cardiac arrhythmia after infusion of dimethyl sulfoxide-cryopreserved hematopoietic stem cells in a patient with severe primary cardiac amyloidosis and end-stage renal failure. *Annals of Hematology*, 79: 523–526
- Zhao X., Koshiba T., Nakamura T., Tsuruyama T., Li Y., Bando T., Wada H., Tanaka K. 2008. ET-Kyoto solution plus dibutyl cyclic adenosine monophosphate is superior to University of Wisconsin solution in rat liver preservation. *Cell Transplantation*, 1: 99–109
- Zhou X., Yuan J., Liu J., Liu B. 2010. Loading trehalose into red blood cells by electroporation and its application in freeze-drying. *Cryo Letters*, 31, 2: 147–156

Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7, 2: 211–228

ZAHVALA

Iskrena zahvala gre direktorju podjetja Educell d. o. o., dr. Miomirju Kneževiču, da mi je dal priložnost in mi finančno omogočil opravljanje doktorske naloge. Hvala tudi za vse vedno spodbudne besede.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Damijanu Miklavčiču za vodenje doktorske naloge, za vse nasvete in spodbudo, da smo projekt pripeljali do konca. Hvala tudi za vse pripombe in temeljit strokovni pregled, tako doktorske naloge kot člankov.

Hvala somentorici viš. znan. sod. dr. Ariani Barlič za vso strokovno pomoč in podporo. Vedno mi je svetovala, me je podpirala in usmerjala raziskovalno delo. Hvala tudi za vso pomoč pri izvedbi poskusov, za vse napotke, temeljite preglede člankov in doktorske naloge.

Hvala članom komisije za oceno in zagovor doktorske disertacije zasl. prof. dr. Jasni Štrus, prof. dr. Gregorju Serši in prof. dr. Marku Kreftu za pregled disertacije in komentarje, ki so izboljšali kvaliteto dela.

Najlepša hvala vsem sodelavcem v podjetju Educell in Biobanka za prijetno in spodbudno delovno okolje. Hvala Urška, Matija, Lenart, Ariana, Tina, Špela, Maja M. J., Anja, Manca, Suzana, Janja, Mateja, Marko, Petra, Dijana, Sabrina, Maja G., Mojca in Mio.

Hvala doc. dr. Janji Dermol-Černe in Lei Vukanović iz Laboratorija za biokibernetiko Fakultete za elektrotehniko, za vso tehnično, laboratorijsko podporo in nasvete pri elektroporatorjih in elektroporaciji.

Hvala Maji za izjemo hitre in temeljite popravke doktorske naloge.

Velika zahvala gre moji družini in prijateljem, ki ste verjeli vame in me spodbujali. Prav posebna zahvala gre moji družini za vse ure, dneve in tedne varstva, da sem lahko dokončala delo. Hvala Davidu, Lii in Patriku za prav posebno motivacijo in ljubezen, zaradi vas so tudi najtežje stvari mogoče.

Hvala vsem, ki ste mi kakorkoli pomagali na tej poti.