UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Barbora Dvořánková

Glykobiologie dlaždicových epitelů

in vitro a *in vivo*

PhD. disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.

PRAHA 2007

Tato PhD. disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného postgraduálního studia biomedicíny na Anatomickém ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Uchazeč: RNDr. Barbora Dvořánková

Školitel: Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.

Datum zahájení studia: 1.10. 2005

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně

a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

V Praze dne..... .....

RNDr. Barbora Dvořánková

PODĚKOVÁNÍ

V prvé řadě bych ráda poděkovala svému školiteli a dlouholetému spolupracovníkovi prof. MUDr. Karlu Smetanovi, DrSc. za podnětné a pečlivé vedení mé disertační práce. Vzhledem k šíři uvedené problematiky jsem měla celou řadu spolupracovníků, bez kterých by nebylo možno provádět takovýto výzkum.

Děkuji svým klinickým kolegům, zejména Prof. MUDr. Radaně Königové, CSc., MUDr. Ludomírovi Brožovi, MUDr. Zuzaně Kapounkové i MUDr. Vlastě Štolbové z Kliniky popáleninové medicíny FNKV za spolupráci při aplikacích kultivovaných epidermálních štěpů a za cenné rady. Dále děkuji MUDr. Ludmile Trešlové, MUDr. Eleně Šilhové a MUDr. Kateřině Petrové ze II. interní kliniky FNKV za spolupráci při léčbě trofických defektů u diabetiků. Jsem také velmi zavázána svým spolupracovníkům z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, zejména Ing. Jiřímu Vacíkovi, CSc., Ing. Jiřímu Labskému, CSc. a Ing. Jiřímu Michálkovi, CSc. za přípravu hydrofilních nosičů pro kultivaci keratinocytů. V neposlední řadě děkuji za spolupráci, četné podněty a podporu svým kolegům z Anatomického ústavu 1. LF UK, jmenovitě MUDr. Lukáši Lacinovi, MUDr. Martinu Chovancovi, PhD., MUDr. Zuzaně Plzákové, PhD. a MUDr. Janu Plzákovi, PhD.

Finančně byly tyto studie podporovány grantovými agenturami GAUK, GAČR a IGA MZ, výzkumnými záměry MŠMT, Evropskou komisí a v neposlední řadě 1. a 3. lékařskou fakultou UK.

OBSAH

1. ÚVOD....6

2. CÍL PRÁCE....8

3. STUDIUM VÍCEVRSTEVNÝCH DLAŽDICOVÝCH EPITELŮ S CÍLEM VYTVOŘIT EPITELIÁLNÍ ŠTĚPY PRO KRYTÍ KOŽNÍCH ZTRÁT....9

3.1. Funkční souvislosti glykofenotypu dlaždicových epitelů za normálních a patologických podmínek a při in vitro kultivacích....11

3.1.1. Dlaždicové epitely jako součást vnějších a vnitřních povrchů....11

3.1.2. Vícevrstevný dlaždicový epitel....12

3.1.3. Galektiny - V. třída živočišných lektinů....13

3.1.4. Souvislost exprese galektinů a diferenciačního stavu buňky....14

3.1.5. Galektiny jako jaderné proteiny....15

3.2. Problematika epidermální kmenové buňky....17

3.2.1. Kmenové buňky....17

3.2.2. Epidermální kmenová buňka....18

3.2.3. Charakteristika epidermální kmenové buňky *in vitro*....19

3.3. Kultivace keratinocytů pro klinické účely....22

3.3.1. Ztrátová poranění kůže....22

3.3.2. Kultivace keratinocytů pro klinické účely....24

3.3.3. Kultivace keratinocytů na polymerním nosiči....24

3.3.4. Využití keratinocytů na polymerním nosiči v klinické praxi....26

3.3.5. Odstranění podpůrných buněk z kultivačního systému....27

4. ZÁVĚR....29

5. SOUHRN....31

6. SUMMARY....33

7. POUŽITÁ LITERATURA....35

1. ÚVOD

Schopnosti regenerace člověka jsou ve srovnání s fylogeneticky níže postavenými obratlovci omezené. Pokud tedy dojde k rozsáhlému ztrátovému poranění či k nevratnému poškození orgánu, je výlučným terapeutickým přístupem transplantace. Jestliže se jedná o ztrátové poranění, je možno většinou provést autotransplantaci, tedy přenést část tkáně (např. kůže, sval, kostní štěp, cévní štěp) na jiné místo na těle pacienta. V této oblasti zejména mikrochirurgické techniky zaznamenaly obrovský rozvoj. V případě nevratného poškození orgánů je však třeba provést alotransplantaci, tedy přenos orgánu či štěpu z jiného člověka – dárce. S výjimkou přenosu mezi jednovaječnými dvojčaty (tzv. syngenní štěp) je transplantace vždy spojena s rozsáhlou imunitní odpovědí příjemce, která může způsobit ztrátu štěpu. Navíc, i když malé, existuje při výkonu riziko přenosu infekce z dárce na příjemce. Především, vzhledem k prudkému nárůstu počtu prováděných transplantací, nestačí dárcovské orgány a štěpy krýt jejich potřebu.

Transplantační krizi danou nedostatkem orgánů a tkání by mohly vyřešit xenotransplantace či tkáňové inženýrství . Tento nový vědní obor se začal rozvíjet až v polovině devadesátých let minulého století (Langer a Vacanti, 1993; Nerem a Sambanis, 1995). Jeho cílem je nejen příprava tkání a orgánů vhodných pro transplantaci, ale i postupy, které urychlují hojení a přestavbu tkání. Do této oblasti patří například použití růstových faktorů (Tsang et al., 2003) či geneticky modifikovaných buněk Těžiště tkáňového inženýrství leží jak v porozumění buňkám, jejich organizaci a nárokům na přenos, tak ve vývoji a přípravě materiálů, které vytvoří kostru budoucí tkáně či orgánu. Pokud se budeme

soustředit pouze na biologicko-medicínskou část oboru, jedná se zejména o následující úkoly:

I. Výběr vhodných buněk (autologní, alogenní či xenogenní), podrobné studium jejich funkčních vlastností, eventuelně jejich ovlivnění pomocí změny vnějšího prostředí či úpravou jejich genetické informace.

II. Využití kmenových buněk, a to jak embryonálních, tak dospělých.

III. Vytvoření takových podmínek, aby byla vyvinutá tkáňová náhrada přijata organismem pacienta.

IV. Zajištění bezpečnosti aplikace tkáňově-inženýrské náhrady.

Prvními komerčně vyráběnými a používanými produkty tkáňového inženýrství se staly syntetické kožní náhrady, obsahující alogenní buňky. TransCyte, výrobek firmy Advanced Tissue Sciences, obsahuje alogenní fibroblasty, Apligraft (Organogenesis) je již dvouvrstvý, jak s fibroblasty, tak i s keratinocyty.

2. CÍL PRÁCE

Na základě prvních, nepříliš úspěšných pokusů o buněčnou terapii se ukazuje, že pouze detailní znalost kmenových buněk umožní jejich efektivní využití v lékařství. Na druhé straně současné výzkumy stále více dokazují, že řada nádorů je onemocněním právě kmenových buněk. Z těchto důvodů je intenzivně studována regulace jednotlivých typů kmenových buněk na molekulární úrovni spolu s cíleným pátráním po specifických fenotypových znacích charakteristických pro jednotlivé typy kmenových buněk. Ve své práci jsem se zaměřila na následující problémy:

- Studium glykobiologického profilu zdravých a nádorových epitelů *in situ* a jejich porovnání s keratinocyty v podmínkách tkáňové kultury.

- Studium exprese znaků, které charakterizují epidermální kmenovou buňku *in vivo* a *in vitro* a jejich srovnání s profilem nádorových buněk vycházejících z dlaždicových epitelů.

- Vývoj a zavedení metodiky kultivace keratinocytů na polymerním nosiči pro léčbu kožních ztrát a ověření jejích výsledků v klinické praxi.

3. STUDIUM VÍCEVRSTEVNÝCH DLAŽDICOVÝCH EPITELŮ S CÍLEM VYTVOŘIT EPITELIÁLNÍ ŠTĚPY PRO KRYTÍ KOŽNÍCH ZTRÁT

Studiem buněčné biologie dlaždicových epitelů se dlouhodobě zabýváme s cílem připravit tkáňově-inženýrské přístupy pro krytí rozsáhlých kožních defektů traumatického či trofického původu. V posledním období jsme se soustředili na studium kmenových buněk lidské epidermis a v neposlední řadě i na zjišťování podílu těchto buněk na vzniku kožních a slizničních malignit nemelanomového původu.

Seznam prací zařazených do disertace následuje:

1. Dvořánková, B., Holíková, Z., Vacík, J., Königová, R., Kapounková, Z., Michálek, J., Přádný, M., Smetana, K., Jr.: Reconstruction of epidermis by grafting keratinocytes cultured on polymer support-clinical study. *Int. J. Dermatol.* 42: 219-223, 2003

2. Dvořánková B, Lacina L, Smetana K Jr, Lensch M, Manning JC, André S, Gabius H-J: Human galectin-2: nuclear presence *in vitro* and its modulation by quiescence/ stress factors. *Histol Histopathol* in press 23, 2008

3. Dvořánková, B., Motlík, J. Holíková, Z., Vacík, J., Smetana, K. Jr.: *Dolichos . biflorus* agglutinin-binding site expression in basal keratinocytes is associated with cell differentiation. *Biol. Cell.* 94: 365-373, 2002

4. Dvořánková, B., Smetana, K. Jr., Chovanec, M., Lacina, L., Štork, J., Plzáková, Z., Galovičová, M., Gabius, H.-J.: Transient expression of keratin K19 is induced in originally negative interfollicular epidermal cells by adhesion of suspended cells. *Int. Molec. Med.* 16: 525-531, 2005

5. Dvořánková, B., Smetana, K., Jr., Jelínková, M., Michálek, J.,Vacík, J: Phenotypic characterization of keratinocytes migrated from polymer support – *in vitro* study. *J. Mat. Sci. Mater Med* 8: 587 – 590, 1997

6. Dvořánková, B., Smetana, K., Jr., Königová, R., Singerová, H., Vacík, J., Jelínková, M., Kapounková, Z., Zahradník, M.: Cultivation and grafting of human keratinocytes on poly HEMA support to the wound bed. *Biomaterials* 19: 141-146, 1998

7. Dvořánková, B., Smetana, K., Jr., Vacík, J., Jelínková, M.: Cultivation of keratinocytes on polyHEMA and their migration and differentiation. *Folia Biol. (Praha)* 42: 83-86, 1996

8. Holíková Z., Hrdličková-Cela E., Plzák J., Smetana K.Jr., Betka J., Dvořánková B. et al: Defining the glycophenotype of squamous epithelia by plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of α2,6- and α2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3. *APMIS* 110: 845-856, 2002

9. Chovanec, M., Smetana, K. Jr., Dvořánková, B., Plzáková, Z., André, S., Gabius, H.-J.: Decrease of nuclear reactivity to growth-regulatory galectin-1 in senescent human keratinocytes and detection of non-uniform staining profile alterations upon prolonged culture for galectins-1 and -3. *Anat. Histol. Embryol.* 33: 348 – 354, 2004

10. Klíma, J., Smetana, K., Jr., Motlík, J., Plzáková, Z., Liu, F.-T., Štork, J., Kaltner, H., Chovanec, M., Dvořánková, B., André, S., Gabius, H.-J.: Comparative phenotypic characterization of keratinocytes originating from hair follicles. *J. Mol Hist* 36: 89-96, 2005

11. Labský, J., Dvořánková, B., Smetana, K., Jr., Holíková, Z., Brož, L., Gabius, H-J.: Mannosides as crucial part of bioactive supports for cultivation of human epidermal keratinocytes without feeder cells. *Biomaterials* 24: 863-872, 2003

12. Lacina L., Smetana K.Jr., Dvořánková B., Štork J., Plzáková Z., Gabius H-J: Immunocyto- and histochemical profiling of nucleostemin expression: Marker of epidermal stem cells? *J Dermatol Sci* 44(2): 73-80, 2006

13. Motlík, J., Klíma, J., Dvořánková, B., Smetana, K.Jr: Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation *Theriogenology* 67: 105-111, 2007

14. Plzák, J., Holíková, Z., Smetana, K., Jr., Dvořánková, B., Hercogová, J., Kaltner, H., Motlík, J., Gabius, H.-J.: Differentiation-dependent glycosylation of cells in squamous epithelia detected by a mammalian lectin. *Cells Tissues Organs* 171: 135-144, 2002

15. Plzák, J., Smetana, K., Jr., Hrdličková, E., Kodet, R., Holíková, Z., Liu, F.-T., Dvořánková, B., Kaltner, H., Betka, J., Gabius, H.-J.: Expression of galectin-3-reactive ligands in squamous cancer and normal epithelial cells as a marker of differentiation. *Int J Oncol* 19: 59-64, 2001.

16. Purkrábková, T., Smetana, K., Jr., Dvořánková, B., Holíková, Z., Böck, C., Lensch, M., André, S., Pytlík, R., Liu, F.-T., Klíma, J., Smetana, K., Motlík, J., Gabius, H.-J.: New aspects of galectin functionality in nuclei of cultured bone marrow stromal and epidermal cells: biotinylated galectins as tool to detect specific binding sites. *Biol Cell* 95: 535-545, 2003

17. Smetana, K., Jr., Dvořánková, B., Chovanec, M., Bouček, J., Klíma, J., Motlík, J., Lensch, M., Kaltner H., André S., Gabius H.-J.: Nuclear presence of adhesion-/growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. *Histochem Cell Biol* 125: 171-182, 2006

18. Smetana, K., Plzák, J, Dvořánková, B., Holíková, Z.: Functional Consequences of the Glycophenotype of Squamous Epithelia – Practical Employment. *Folia Biologica (Praha)* 49: 118-127, 2003

V následujícím textu jsou i odkazy tyto publikace označeny modrým číslem.

3.1. Funkční souvislosti glykofenotypu dlaždicových epitelů za normálních a patologických podmínek a při in vitro kultivacích

3.1.1. Dlaždicové epitely jako součást vnějších a vnitřních povrchů

Stavba těchto epitelů je v principu identická. V detailech se však liší podle místa svého výskytu. Jako klasický příklad bude demonstrována stavba kůže. Na jejím povrchu leží pokožka-epidermis. Ta je tvořena pěti vrstvami – stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum, statum lucidum a stratum corneum. Stratum corneum – zrohovatělá vrstva na samém povrchu je tvořena silně oploštěnými a keratinizovanými buňkami, které se postupně odlupují. Její povrch je povlečen tenkou vrstvou lipidů, která dělá pokožku nesmáčivou. Základními buňkami epidermis jsou keratinocyty. Ty vznikají ve stratum basale mitotickým dělením, postupně se posouvají k povrchu a ztrácejí mitotickou aktivitu. V poslední fázi se oplošťují a ztrácejí vodu, organely a jádra. Keratinocyty produkují keratiny, které v buňce tvoří intermediární filamenta. Tyto fibrilární proteiny jsou mechanicky odolné, hydrofobní a chemicky nereaktivní. Člověk má asi 60 genů pro keratiny, z nichž se v každé epitelové tkáni exprimuje jen malá skupina. Tento systém zřejmě umožňuje jemné vyladění funkce cytoskeletu v jednotlivých tkáních. V dalším textu bude exprese jednotlivých keratinů v závislosti na diferenciačním stupni keratinocytů podrobněji rozpracována (Kanitakis, 2002).

V hlubokých vrstvách epidermis jsou uloženy pigmentové buňky, melanocyty. V jejich cytoplasmě se tvoří melanosomy, prekurzory hnědého barviva melaninu. Tyto buňky, původem z neurální lišty, chrání bazální vrstvu epidermis před UV zářením. Langerhansovy dendritické buňky se vyskytují ve stratum spinosum. Řadí se k buňkám monocytové řady a hrají důležitou úlohu

v imunitním systému kůže. Dovedou vázat antigen a předkládat ho T-lymfocytům. V nejhlubších částech epidermis jsou uloženy Merkelovy buňky, které mají vztah ke kožním receptorům. (Halata et al., 2003).

3.1.2. Vícevrstevný dlaždicový epitel

Epitel je avaskulární tkáň, která tvoří vnější kryt těla, výstelku tělních dutin a výstelku trávicího, dýchacího a urogenitálního ústrojí. Prenatálně se tento epitel podílí i na vývoji příslušných žláz a dalších derivátů (vlas, nehet, zub). Epitelové buňky mají 3 charakteristické rysy: a) přiléhají těsně jedna ke druhé s minimálním množstvím mezibuněčné hmoty; b) vykazují funkční stejně jako morfologickou polaritu (apikální, laterální a basální doména); c) jsou přichycené k bazální membráně, která je tvořena proteiny a polysacharidy. Epitely můžeme třídit podle různých hledisek; podle tvaru na plochý (dlaždicový), cylindrický a kubický; podle stavby na jednovrstevný či vícevrstevný; podle polohy na krycí a výstelkový epitel (Ross et Pawlina, 2006). V předložené disertaci se budeme věnovat vícevrstevnému dlaždicovému epitelu, který je u savců lokalizován na místech vystavených mechanickému tlaku. Tvoří bariéru mezi naším organismem a vnějším prostředím a chrání ho před nežádoucími účinky okolí, zejména vysycháním, tepelnými a chemickými vlivy či mikroorganismy. Navíc produkuje i značné množství cytokinů a růstových faktorů (Uchi et al., 2000), uplatňujících se při poranění a u imunitní odpovědi. Typickým zástupcem je povrchová vrstva kůže – epidermis, ale patří sem i sliznice (ústní dutina, hlasivky, sliznice hltanu a jícnu, či spojivky a rohovky). Většina dlaždicových epitelů vychází z ektodermu, menší část z entodermu (sliznice hltanu, jícnu a hlasivek) (Seery, 2002).

3.1.3. Galektiny - V. třída živočišných lektinů

Dlaždicové epitely jsou stratifikovány nejen morfologicky, ale i funkčně. Této skutečnosti odpovídá i exprese řady molekul (adhezivní molekuly, keratiny.....). Poměrně málo je však známo o zonálním výskytu sacharidů a jejich receptorů lektinů. Lektiny jsou proteiny (glykoproteiny) schopné specificky rozpoznávat a vázat cukerné motivy. Tyto molekuly nejsou imunoglobuliny ani enzymy. Mnohé lektiny jsou tvořeny několika podjednotkami a mají více vazebných míst. Proto mohou vyvolat precipitaci částic obsahujících specifické sacharidy. Schopnost aglutinovat krevní buňky vedla ke staršímu názvu rostlinných lektinů fytohemaglutininy. Vazba lektinu se specifickým ligandem nemá charakter kovalentní vazby, ale je blízká interakci protilátka-antigen. Lektiny jsou jak rostlinného, tak živočišného a bakteriálního původu. Na základě strukturního uspořádání rozlišujeme pět tříd živočišných lektinů. V naší laboratoři se dlouhodobě věnujeme studiu rodiny galektinů (Barondes et al., 1994). Galektiny splňují dvě kriteria: - vazba β-galaktosidů a - výrazná homogenita sekvence cukr-rozpoznávající domény. Funkce galektinů je velmi komplexní. Podílejí se na buněčné adhezi i při mezibuněčných interakcích, imunomodulaci a při zánětlivých procesech. Uvnitř buňky se uplatní při řízení buněčného dělení, apoptóze a sestřihu pre-mRNA (Gabius, 1997, Leffler et al., 2004). V současné době známe minimálně 14 galektinů, které rozdělujeme do tří skupin. Galektiny první skupiny (Gal-1,-2,-5,-7,-10,-11,-13,-14) obsahují jednu cukr rozpoznávající doménu, členové druhé skupiny (Gal-4,-6,-8,-9,-12) mají tyto oblasti dvě, a to identické. Třetí skupinu tvoří pouze galektin-3 (Gal-3), který má jednu cukr rozpoznávající doménu. Obsahuje však atypické uskupení aminokyselin na svém peptidovém řetězci, které umožňuje vzájemnou vazbu jednotlivých molekul

galektinu-3 (Liu et al., 2002). Kromě obvyklých β-galaktosidů je tento galektin schopen rozpoznávat i trisacharidy krevních skupin A a B a poly N-acetyllaktosaminy. Studium exprese galektinů v průběhu embryonálního vývoje i dospělosti u myší ukázalo, že jednotlivé galektiny jsou tkáňově specifické a vyskytují se v různých obdobích vývoje organismu (Colnot et al., 1996).

3.1.4. Souvislost exprese galektinů a diferenciačního stavu buňky

Ve vícevrstevných dlaždicových epitelech hrají významnou roli zejména Gal-1, Gal-3 a Gal-7 **(18)**. Kmenové i přechodně se dělící buňky jsou umístěny v bazální vrstvě těchto epitelů. V oblasti vlasu jsou přítomny i ve ztluštění zevní vlasové pochvy. Tyto buňky se svým fenotypem liší od buněk suprabazálních, a to zejména v expresi cytoskeletálních proteinů, integrinových a kadherinových receptorů. Exprese „glykokódu“, tedy charakteristických cukerných motivů, může být různá v jednotlivých vrstvách epitelů (Villalobo et Gabius, 1998). Při studiu zdravé lidské epidermis jsme zjistili, že Gal-1, stejně jako cukerné epitopy reaktivní pro tento galektin, jsou exprimovány v buňkách bazální a suprabazální vrstvy, a to zejména v cytoplasmě (Plzák et al., 2000). Obdobné výsledky byly získány i pro Gal-7. Naproti tomu Gal-3 a jeho reaktivní epitopy se vyskytovaly převážně suprabazálně **(14,15)** v již diferencovaných postmitotických buňkách, u kterých jsme nenalezli expresi Ki-67 (znak buněčné proliferace) ani β1 řetězců integrinových receptorů **(8)**. Exprese vazebných míst pro Gal-3 se vyskytovala pouze u keratin10 pozitivních buněk, vždy v místech mezibuněčných kontaktů, a odpovídala expresi desmozomálních proteinů. Vzhledem k tomu, že Gal-3 má snahu vytvářet multivalenční oligomery, může se účastnit při regulaci síly mezibuněčných spojení. Obdobný nález jsme učinili i u kultivovaných lidských keratinocytů. U menších kolonií byly buňky s vazebnými místy pro Gal-3

umístěny v jejich středu, obklopené buňkami pozitivními na β1 integrin a Ki-67. Tato situace je obdobná jako u spinocelulárních nádorů (hlavy a krku), kde se exprese epitopů reaktivních pro Gal-3 vyskytuje u diferencovaných buněk v centru nádoru **(15)**. Zjistili jsme, že glykosylační profily stanovené pomocí vazby Gal-3 jsou citlivým fenotypickým znakem diferenciace epidermálních buněk **(14)**, což by mohlo být využito zejména v histopatologické diagnostice spinocelulárních nádorů hlavy a krku. Klinická studie, ve které bylo sledováno přežívání pacientů v závislosti na glykobiologickém profilu nádoru, potvrdila, že detekce volných vazebných míst pro Gal-3 může sloužit jako prognostický ukazatel u dlaždicových nádorů hlavy a krku (Plzák, 2004). Málo diferencované buňky dlaždicových nádorů jsou charakterizovány expresí kyseliny sialové v poloze α 2,6; naproti tomu diferencované buňky jsou pozitivní pro kyselinu α 2,3 sialovou. Kolokalizační studií na úrovni jedné buňky bylo zjištěno, že zatímco α 2,6 navázaná sialová kyselina maskuje celý cukerný epitop a brání tak vazbě galektinu-3, sialová kyselina v pozici α 2,3 vazbě galektinu nebrání. Tato skutečnost by mohla být klinicky důležitá, protože vysvětluje i větší mobilitu nádorových buněk a tím i jejich větší ochotu metastazovat **(8)**.

3.1.5. Galektiny jako jaderné proteiny

Jak bylo uvedeno dříve, galektiny hrají roli jak při dějích probíhajících vně buňky, tak i intracelulárně. I když bylo mnoho galektinů identifikováno v buněčném jádře (Wang et al. 2004), nejvíce je prozkoumána úloha galektinu-1 a -3. Úroveň jaderné exprese galektinu-1 a jeho vazebných míst v jádře vypovídá o stavu diferenciace keratinocytů **(9,10,16,17)**. Galektin-2 se vyskytuje za normálních i patologických podmínek v cytoplasmě a částečně i jádře buněk mnoha tkání, zejména trávicího a urogenitálního ústrojí (Saal et al. 2005). Na

rozdíl od Gal-1 a Gal-3, které hrají roli při regulaci proliferace a sestřihu pre-mRNA, je jeho funkce neznámá. Studovali jsme výskyt Gal-2 v jádře u pěti různých typů fibroblastů (lidské dermální fibroblasty, fibroblasty ze stromatu bazaliomu před a po transformaci, linie lidských embryonálních fibroblastů, linie myších embryonálních fibroblastů) a dvou typů keratinocytů (lidské zdravé interfolikulární keratinocyty; linie lidských nádorových keratinocytů) **(2)**. Buňky byly kultivovány za normálních podmínek anebo vystaveny stresu (ošetření antiproliferačním antibiotikem Mitomycinem C, kultivace v bezsérovém médiu, ozáření UV paprsky). Zjistili jsme, že exprese Gal-2 je specifická pouze pro určité buněčné typy. Lidské keratinocyty, zdravé i nádorové, neexprimují Gal-2 ani za stresových podmínek **(2,17)**. Stejně se chovají i netransformované fibroblasty ze stromatu bazaliomu. Naproti tomu po transformaci těchto fibroblastů (vlivem dlouhodobé kultivace) lze stanovit Gal-2 v jádrech všech buněk. Jaderná funkce Gal-1 a Gal-3 je svázána se sestřihem pre-mRNA , o čemž svědčí i kolokalizace se sestřihovým faktorem SC35 **(16,17)**. Podíl Gal-2 na sestřihu pre-mRNA není pravděpodobný, neboť ke kolokalizaci s SC35 nedocházelo. Skutečnost, že Gal-2 nebyl nikdy přítomen v jádrech dělících se buněk (Ki67 pozitivních) nás vedla k domněnce, že je exprimován především v nedělících se buňkách (Schlüter et al., 1993). Výsledky získané u fibroblastů ze stromatu bazaliomu po jejich transformaci **(2)** však naznačily, že Gal-2 je spíše svázán s vlastní expresí proteinu Ki-67 než s buněčným dělením.

V jádře je Gal-2 lokalizován do PML jaderných tělísek (nuclear bodies) v interchromatinovém prostoru. Tato tělíska jsou zásobárnou různých proteinů a jsou tvořena v buňkách, které jsou ve stresových podmínkách. Variabilita jejich účinků je velmi široká a je dána složením proteinů v PML tělískách **(2)**.

3.2. Problematika epidermální kmenové buňky

3.2.1. Kmenové buňky

Velký zájem o kmenové buňky je dán snahou využít tyto buňky zejména k rekonstrukci poškozených tkání. V procesu hojení by mohly být zdrojem nových buněk, nebo by produkcí růstových faktorů mohly reaktivovat vlastní endogenní kmenové buňky nacházející se v místě poškození (rescue effect). Kmenové buňky jsou schopny časově neomezené sebeobnovy a zároveň produkce diferencovaných potomků obvykle nazývaných progenitorové buňky. Nomenklatura kmenových buněk není jednotná, ale v principu lze říci, že rozeznáváme kmenové buňky embryonální a ty vyskytující se i v tkáních dospělého jedince. Zcela výjimečné jsou totipotentní buňky, které obsahují kompletní genetickou informaci pro celý organizmus. Patří sem oplozené vajíčko a buňky vznikající jeho dělením maximálně do počtu 16. Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní a lze je laboratorně připravit z vnitřní buněčné masy nacházející se v blastocystě. Místo a doba vzniku kmenových buněk dospělého organizmu nejsou v průběhu ontogeneze zárodku dosud přesně definovány. Na rozdíl od pluripotentních embryonálních kmenových buněk (schopné dát vznik všem typům buněk jedince) jsou „dospělé“ kmenové buňky multipotentní (zdroj omezeného počtu buněčných typů) či monopotentní (zdroj jediného buněčného typu). Jejich funkční vlastnosti včetně „kmenovosti“ jsou výrazně ovlivněné mikroprostředím, v němž se nalézají. Toto mikroprostředí je pro daný typ kmenové buňky specifické a nazývá se niche. Je známo, že niche zahrnuje komplex vzájemných buněčných a molekulárních interakcí důležitých pro správné fungování kmenové buňky (Lanza et al., 2004).

3.2.2. Epidermální kmenová buňka

Zdrojem nových keratinocytů jsou epidermální kmenové buňky. Probíhá u nich asymetrické dělení, při němž vzniká nová kmenová buňka a tzv. přechodně se dělící buňka (transit amplifying cell). Epidermální kmenové buňky mají pomalý buněčný cyklus, avšak schopnost dělení si zachovávají po celou dobu existence organizmu, čímž je umožněna neustálá obnova epidermis. Přechodně se dělící buňky se dělí velmi rychle, ale jejich proliferační aktivita je omezena pouze na tři až šest cyklů, takže v konečném důsledku stojí tyto buňky na začátku terminální diferenciace. Jejich potomky lze již považovat za postmitotické buňky. Stratum basale tedy obsahuje epidermální kmenové buňky a jejich dceřinné buňky, jejichž potomci se oddělují od bazální membrány a posouvají se suprabazálně.

Údaje o přesné poloze epidermální kmenové buňky v interfolikulární epidermis se liší. Podle některých badatelů jsou v oblasti vrcholu dermální papily, podle jiných na nejnižším místě mezi dvěma papilami (Jensen et al., 1999; Morris et Potten, 1994). Tyto buňky byly rovněž nalezeny ve ztluštění zevní epitelové pochvy vlasového folikulu mezi vyústěním mazové žlázy a úponem musculus arrector pili (Cotsarelis et al., 1990). Tam se nacházejí i multipotentní kmenové buňky, které vycestovaly z neurální lišty (Sieber-Blum et al., 2004). Jejich podíl na vytváření niche jako unikátního mikroprostředí nutného pro správné fungování epidermální kmenové buňky dosud nebyl prokázán, ale je velmi pravděpodobný.

K rozlišení populací keratinocytů bazální vrstvy s různou délkou buněčného cyklu vedlo mapování proliferační aktivity těchto buněk pomocí značeného ^{3}H-thymidinu (Braun et al., 2003) nebo 5-Br-2-deoxyuridinu. Přesněji však lze potencionální epidermální kmenovou buňku definovat kombinací vysoké

exprese α6 integrinu a nízké exprese transferinového receptoru CD71 (Webb et al., 2004). Dalším možným znakem epidermální kmenové buňky je exprese specifických keratinů, tvořících cytoskelet epitelových buněk. Například exprese keratinu 5 a 14 je specifická pro buňky bazální vrstvy epidermis a keratinu 1 a 10 pro suprabazální keratinocyty (Fuchs, 1990). Keratin19 se nachází pouze v malém počtu buněk. Ve fetální kůži je přítomen v celé bazální vrstvě (Morris et Potten, 1994), v kůži dospělého člověka je lokalizován pouze ve vnější epitelové pochvě vlasového folikulu. Keratin 19 exprimující buňky jsou zároveň vysoce pozitivní na α3β1 integrin.

Dalším možným znakem epidermální kmenové buňky je protein ΔNp63α. Je to jedna z variant genu p63. Tento gen je svou strukturou homologní s genem pro p53, který je jedním s nejvýznamnějších antionkogenů blokujících buněčnou replikaci při poškození DNA. Produkty genu p63 existují v různých izotypech, jejichž funkce mohou být stejné (TAp63) nebo protichůdné (ΔNp63) k funkci p53. Za normálních podmínek je vysoká pozitivita pro p63 v embryonálním ektodermu a v jádrech buněk bazální vrstvy epiteliálních tkání. Poslední práce ukazují, že varianta TAp63 je potřebná pro zahájení programu epiteliální stratifikace v embryonálním vývoji, zatímco varianta ΔNp63 je rozhodující při inhibici terminální diferenciace zralé epidermis (Koster et al., 2004)).

3.2.3. Charakteristika epidermální kmenové buňky *in vitro*

In vitro je nutno kultivovat lidské keratinocyty za přítomnosti podpůrných buněk - fibroblastů se zastavenou proliferací. Tyto podpůrné buňky umožňují adhezi keratinocytů, která je důležitá pro jejich další růst. Kultury lidských keratinocytů obsahují epidermální kmenové buňky, přechodně se dělící buňky i postmitotické buňky na počátku terminální diferenciace. Exprese vazebných míst

pro rostlinný lektin *Dolichos biflorus* agglutinin je znakem velmi ranného stádia diferenciace epidermálních buněk, a to jak za *in vivo,* tak i za *in vitro* podmínek **(3)**. Přítomnost epidermálních kmenových buněk udržuje životnost kultury. Také *in vitro* je patrná proliferační heterogenita keratinocytů. Některé buňky vytvářejí velké, dobře se dělící kolonie, jiné se rozdělí pouze několikrát a nastoupí terminální diferenciaci (tzv. abortivní kolonie). V primární kultuře je životnost keratinocytů omezená, což je dáno omezeným počtem buněčných cyklů pěstovaných buněk. Počet epidermálních kmenových buněk se s délkou kultivace snižuje, z čehož vyplývá, že *in vitro* mají na rozdíl od organizmu i tyto buňky omezený počet dělení. To je dáno tím, že nejsme dosud schopni vytvořit *in vitro* fungující mikroprostředí-niche. Jak bylo zmíněno výše, ve vlasovém folikulu jsou uloženy multipotentní kmenové epidermální buňky. Kultura buněk izolovaných z vlasového folikulu se vydrží dělit mnohem déle než kultura připravená z interfolikulární epidermis. Zatímco kultura buněk z interfolikulární epidermis končí svůj růst ve stádiu terminální diferenciace, kultura z vlasového folikulu ve stádiu proliferační senescence **(9,13)**.

Dále bylo zjištěno, že buňky pozitivní na protein ΔNp63, tedy epidermální kmenové buňky či buňky jim blízké, exprimují v jádrech endogenní lektin Gal-1 a epitopy rozpoznávané tímto galektinem, ne však Gal-3 **(9,10,16)**. Vazebná místa pro Gal-1 v jádře kolokalizují s místy akumulace sestřihového faktoru SC35 a zcela vymizí po ošetření buněk RNázou. Je tedy velmi pravděpodobné, že Gal-1 je zapojen do sestřihu pre-mRNA **(16)**. Navíc se zdá, že proliferující buňky stratum basale včetně buněk kmenových obsahují na svých površích oligosacharidové řetězce s terminálně vázanou kyselinou N-acetylneuraminovou v pozici α2,6 **(8)**.

Jak již bylo zmíněno výše, exprese keratinu 19 a vazebná místa pro vazbu galektinu-1 v jádře jsou znaky, které mohou charakterizovat epidermální kmenovou buňku (Michel et al., 1996; Commo et al., 2000). Keratin 19 se v postnatálním období vyskytuje pouze u populace keratinocytů ve vlasovém folikulu. *In situ* také keratinocyty basaliomu, nádoru, který vzniká ve vlasovém folikulu, jsou u některých pacientů pozitivní na keratin 19 **(4)**. Zjistili jsme však, že za *in vitro* podmínek se krátkodobě (cca do 48 hodin po adhezi) objevuje exprese tohoto keratinu i u buněk získaných z interfolikulární epidermis **(4)**. Jedná se o velmi malé buňky (10 μm), které jsou bohaté na β1 integrin a mají v jádře vazebná místa pro Gal-1. Navíc jsou tyto buňky schopny přežívat více než 24 hodin bez adheze, což u většiny buněk vyvolává terminální diferenciaci a anoikis (řízenou buněčnou smrt vyvolanou ztrátou adheze). Jak se zdá, re-adheze této malé buněčné populace „zapíná“ expresi keratinu 19, která je však pouze dočasná, neboť chybí prostředí (niche), které by její kmenovost udrželo. Kultivované buňky získané z vlasového folikulu mají tytéž rozměry, jsou též bohaté na β1 integrin, avšak exprese keratinu 19 u nich přetrvává déle. To je ve shodě s *in vivo* podmínkami. Nicméně exprese keratinu 19 nemusí být vždy známkou kmenovosti keratinocytů. I u dlouhodobě kultivovaných buněk (folikulárních i interfolikulárních) se keratin 19 objevuje, i když se jedná o široce rozprostřené buňky se znaky terminální diferenciace **(4)**.

Dalším možným znakem kmenovosti epidermálních kmenových buněk by mohl být nucleostemin, který se vyskytuje u kmenových buněk hematopoetických a nervových, stejně jako u nádorů z nich vycházejících (Tsai et McKay, 2002). Později byl jeho výskyt potvrzen i u buněk nádorů epiteliálního původu (Sijin et al., 2004). Tento protein, který migruje mezi jadérky a nukleoplasmou, kontroluje

proces proliferace a nástup apoptózy. V lidské epidermis se však in situ vyskytuje nejen u všech buněk bazální vrstvy, ale též u buněk postmitotických (keratin 10 pozitivních), tedy v oblasti, kterou dříve anatomové označovali jako stratum germinativum **(12)**. U buněk basaliomu byla exprese nukleosteminu výrazně vyšší než u buněk zdravé epidermis. Při pokusech *in vitro* pouze folikulární keratinocyty kultivované v přítomnosti podpůrných 3T3 buněk exprimovaly nukleostemin ve svých jadércích. Nepřítomnost fibroblastů v kultivačním systému způsobila výraznou redukci přítomnosti nukleosteminu; interfolikulárními keratinocyty nebyl produkován nikdy. To je ve shodě s poznatkem, že epitelo-mesenchymální interakce je důležitá pro vytváření epidermis včetně fungování kmenových epidermálních buněk (Yamaguchi et al., 1999). V případě kultivovaných nádorových keratinocytů (FaDu linie – nádor orofaryngu), které se kultivují bez podpůrných buněk, byl nukleostemin přítomen téměř ve všech buňkách. Navzdory těmto významným výsledkům nelze expresi nukleosteminu považovat za znak epidermální kmenové buňky **(12)**.

3.3. Kultivace keratinocytů pro klinické účely

3.3.1. Ztrátová poranění kůže

Kůže je největším orgánem lidského těla, u dospělého člověka dosahuje plochy 1,6 – 2,0 m^2. Tvoří ochranný kryt těla, slouží jako vylučovací orgán, podílí se na termoregulaci, obsahuje i velké množství volných nervových zakončení a specializovaných receptorů. Je orgánem hmatu a umožňuje vnímání bolesti, tepla a chladu. Zároveň je i velkým endokrinním orgánem. Ztráta uvedených funkcí kůže ve velkém rozsahu (termický či mechanický úraz) je závažným, až smrt

způsobujícím poraněním. Závisí na hloubce a rozsahu postižení, zda se zraněná plocha může zhojit sama, či zda je nutné provést autotransplantaci. Alotransplantace (s výjimkou syngenního štěpu) je vždy pouze dočasným řešením (Königová et al., 1999). Vzhledem k tomu, že odběrové plochy pro autotransplantáty jsou omezené, hledal se způsob, jak z odebraných štěpů pokrýt co největší rannou plochu (síťování autotransplantátů, smíšená autotransplantace, sazenicová metoda, Meekova technika). Největší plošné expanze se dosáhlo při užití kultivovaných epidermálních štěpů (Muehleman et al, 1993). Již počátkem minulého století bylo dokázáno, že jsou-li kožní fragmenty umístěny na vhodný podklad ve vhodném mediu (např. fyziologický roztok obohacený glukózou a sérem), dochází k rozrůstání epitelových i pojivových buněk – keratinocytů a fibroblastů (Carrel et Burrows, 1910). Ve 40. letech došlo k enzymatické separaci epidermis od dermis a takto získané keratinocyty byly použity pro tkáňové kultivace (Medawar, 1948). Ukázalo se, že přítomnost dermálních elementů je rozhodující pro přípravu epidermálních kultivátů (Karasek et Charlton, 1971). Přítomnost letálně ozářených 3T3 buněk (linie embryonálních myších fibroblastů) zajišťovala dobrý růst keratinocytů a zabraňovala přerůstání vlastních fibroblastů. Když byl poznán účinek epidermálního růstového faktoru (EGF) na růst keratinocytů, byla metodika umožňující přípravu epidermálních štěpů pro klinické účely úspěšně završena (Green et al., 1979). Pro léčbu pacientů byly autologní kultivované epidermální štěpy použity poprvé v Bostonu v roce 1981 (O'Connor et al., 1981).

3.3.2. Kultivace keratinocytů pro klinické účely

Zdrojem epidermálních štěpů pro klinické účely je jemný dermo-epidermální štěp. Tento štěp je enzymaticky (působením trypsinu) rozvolněn na dermis a epidermis, ze které je získána suspenze keratinocytů. Keratinocyty jsou buňky, které lze kultivovat jen obtížně. Pro svůj růst vyžadují přítomnost podpůrných buněk, které zlepšují buněčnou adhezi keratinocytů ke dnu kultivační nádoby a svými metabolity stimulují i jejich buněčné dělení. Jako podpůrné buňky se nejčastěji používají myší embryonální fibroblasty (3T3 linie), u kterých je zastavena proliferační schopnost, a to buď pomocí γ-záření nebo antibiotika Mitomycinu C. V kultuře proliferují pouze ty keratinocyty, které nejsou terminálně diferencované; největší růstový potenciál vykazují kmenové buňky (De Luca et al., 1992). Keratinocyty tvoří kruhovité kolonie, které se postupně zvětšují až splývají a při tom ničí porost podpůrných buněk, takže za 10 až 14 dní dosáhnou souvislého porostu (konfluence). Opakovaným pasážováním a plošnou expanzí lze v několika týdnech dosáhnou požadované plochy v řádech tisíců až desetitisíců cm^2. V konečné fázi je souvislý několikavrstevný porost keratinocytů odvolněn jako štěp pomocí enzymu proteázy ode dna kultivační nádoby a uchycený na textilním nosiči je aplikován na rannou plochu pacienta.

3.3.3. Kultivace keratinocytů na polymerním nosiči

Tento zcela nový přístup k léčbě kožních ztrát vyvolal velké nadšení pro buněčnou terapii jak u výzkumných, tak klinických pracovníků. Klinická zkušenost však ukázala, jak je obtížné vytvořit podmínky pro dobré přihojení kultivovaných epidermálních štěpů. Velký důraz byl kladen na přípravu ranné plochy; jako podklad pro kultiváty byla použita alodermis (Hickerson et al., 1994)

a později i semisyntetická náhrada dermis Integra (Pandya et al., 1998). Nejvíce však byly kultivované epidermální štěpy po aplikaci ohroženy vyschnutím či infekcí (Elliott et Vandervord, 2002), která je u popálených pacientů velkým problémem. Proto byly hledány nové způsoby, jak *in vitro* připravené buňky aplikovat. Kultivované keratinocyty byly resuspendovány ve fibrinovém lepidle a poté nastříkány na rannou plochu (Kaiser et al., 1994; Harkin et al., 2006), která tak vlastně sloužila jako kultivační podklad pro jejich rozrůstání. Dále byly keratinocyty kultivovány na nosiči; jednalo se buď o acelulární dermis (Matouskova et al., 1993; Herson et al., 2001) nebo o nějaké syntetické materiály (Myers et al., 1997). My jsme si pro tento účel zvolili hydrogel poly(2-hydroxyetyl metakrylát), tzv. polyHEMA, který je znám především jako materiál na výrobu kontaktních čoček. PolyHEMA má výhodné vlastnosti (obsahuje 38% tekutiny, je zcela čirý a mechanicky pevný), je to však materiál, na který se díky vysoké míře hydrofility špatně adsorbují bílkoviny. Je tedy obtížně kolonizován buňkami (Watt et al., 1988). Na druhou stranu, i když je adsorpce fibronektinu na tento hydrogel nižší, jeho prostorová konfigurace je vhodnější pro adhezi buněk, než u jiných syntetických materiálů (Grinell et Feld, 1982). Zjistili jsme, že ošetření hydrogelového nosiče bovinním sérem (optimální koncentrace 25% v/v) zajistí dostatečnou sorpci bílkovin, takže je možná adheze podpůrných 3T3 buněk a následně i adheze a růst keratinocytů **(7)**.

Při kultivaci na nosiči jsou buňky aplikovány na rannou plochu obráceně, tedy „vzhůru nohama“. Vytvořili jsme laboratorní model ranné plochy – kultivační misku osázenou ozářenými 3T3 fibroblasty. Díky slabé adhezi buněk k polyHEMA nosiči jsou subkonfluentní keratinocyty schopné změnit polarizaci a kolonizovat experimentální rannou plochu. Zde tvoří nové kolonie, které mají

dobrý proliferační potenciál (exprese PCNA a Ki67). Tyto buňky také exprimují α2, α3 a α5β1 integrinové řetězce, které jsou charakteristické pro keratinocyty bazální vrstvy a objevují se *in vivo* v průběhu spontánního hojení rány z okrajů **(5)**. V průběhu dlouhodobé kultivace buňky postupně jeví znaky diferenciace, ve druhém týdnu produkují involukrin a ve třetím keratin 10 **(5,7)**. Je tedy zřejmé, že buňky na polymerním nosiči jsou schopné osídlit rannou plochu a vytvořit zde souvislý porost, který časem funkčně stratifikuje. V praxi byly tyto štěpy použity k léčbě popálených a pacientů s trofickými defekty, zejména diabetiků **(1,6)**.

3.3.4. Využití keratinocytů na polymerním nosiči v klinické praxi

Keratinocyty kultivované na polymerním nosiči byly použity k léčbě 19 pacientů s popáleninovým úrazem a 13 pacientů s trofickými defekty **(1)**. U popálených pacientů se jednalo o popáleniny II. a III. stupně a o odběrové plochy. Velikost použitých krytů byla 10 až 500 cm^2 a aplikace keratinocytů nebyla prováděna opakovaně. Defekty byly zcela zhojeny v 89,5%; ke zmenšení ranné plochy došlo v 5%. U jednoho pacienta neměla léčba žádný efekt.

Aplikace tohoto krytu na plochu nekrektomovanou až na fascii prokázala, že autologní keratinocyty jsou schopné vytvořit trvalý uzávěr ranné plochy. Dlouhodobé sledování prokázalo vznik normální stratifikované epidermis (suprabazální vrstvy pozitivní na keratin 10) s intaktní bazální laminou již po 16 dnech. Vytvoření pevného dermo-epidermálního spojení (rete ridges) bylo pozorováno po 46 dnech **(6)**. Po dvou letech plocha nejevila známky jizvení, histologický profil byl shodný se zdravou kůží a byla dokonce prokázána přítomnost Langerhansových buněk **(1)**.

Dvě třetiny pacientů s trofickými defekty trpěly cukrovkou, a proto byla léčba velmi obtížná. K léčbě byly využívány jak keratinocyty autologní, tak často

i keratinocyty alogenní, u nichž lze očekávat pouze stimulaci hojení. Kultivované štěpy byly ve většině případů aplikovány opakovaně. K úplnému zhojení trofického defektu došlo pouze u tří pacientů (23%), výrazné zmenšení ranné plochy nastalo u šesti pacientů (46%). U čtyř pacientů nevyvolala léčba žádný efekt a u dvou musela být dokonce přerušena. Ukazuje se, že keratinocyty kultivované na polymerním nosiči jsou velmi dobrým krytem zejména pro léčbu traumatických kožních ztrát. V případě chronických trofických defektů, zejména tam, kde jsou přidruženy i další komplikace jako angiopatie a neuropatie, je léčba velmi obtížná (Waugh et Sherratt, 2007), a tomu odpovídá i účinnost námi použité léčby **(6)**.

3.3.5. Odstranění podpůrných buněk z kultivačního systému

Jak jsem uvedla již dříve, podpůrné buňky jsou nezbytné při přípravě epidermálních štěpů pro klinické účely. I když jsou v průběhu kultivace a před vlastní aplikací zcela odstraněny, jedná se o kokultivaci s cizorodými buňkami, což může zhoršovat prognózu aplikovaného štěpu a zároveň je tato skutečnost nepříznivá i z hlediska bezpečnostního (priony?). Jako alternativa k použití těchto pomocných buněk byla vyvinuta speciální bezsérová média s definovaným přídavkem podpůrných látek (Daley et al., 1990), ale tato metoda nenašla příliš široké uplatnění i pro vysoké finanční náklady. V kultuře jsou schopny růst buňky bazální vrstvy, které jsou *in vivo* uchyceny k bazální membráně, jejíž významnou součástí je laminin. Tento protein je silně glykosylován. Obsahuje četné oligosacharidy bohaté na manózu. Za použití lektinové a reversní lektinové histochemie při studiu lidské kůže jsme zjistili, že vazba keratinocytů k lamininu je kromě dalších typů receptorů realizována i prostřednictvím lektinů

rozpoznávajících manózu **(11)**. Keratinocyty dobře adherovaly na kultivační povrchy potažené syntetickými neoglykoproteiny obsahujícími manózu i za nepřítomnosti podpůrných buněk. Později byly manosidy kovalentně navázány i na hygrogelový nosič (polyHEMA či jeho kopolymery). Prokázali jsme, že je možno kultivovat keratinocyty i bez přítomnosti podpůrných buněk na bioaktivním nosiči s imobilizovanou manózou **(11)**. Tento princip imobilizace látek, které jsou specificky rozpoznávané jednotlivými typy buněk, na polymerní nosič by bylo možno využít zejména při výzkumech různorodých buněčných populací.

4. ZÁVĚR

Závěry studií zařazených do této disertace ukázaly, že kultivované keratinocyty představují dobrý model pro výzkum epidermální kmenové buňky.

- Využití glykobiologického přístupu přineslo nová data využitelná při diagnostice nádorů, studiu kmenových buněk a při buněčné terapii kožních defektů. Našli jsme dobrou shodu mezi podmínkami *in vivo* i *in vitro*. Zjistili jsme, že vazba galektinu-3 je citlivým fenotypovým znakem diferenciace epidermálních buněk, jaderná exprese galektinu-1 u kultivovaných keratinocytů ukazuje, že se jedná o buňky blízké buňkám kmenovým. Zcela nové jsou i naše poznatky o jaderné expresi galektinu-2.
- V části věnované studiu biologie kmenových buněk jsme prokázali, že i ty keratinocyty, které již nemají molekulární charakteristiku buněk kmenových, změní svůj fenotyp do „kmenové“ podoby po ztrátě adheze a opětovné re-adhezi. Tyto buňky jsou navíc odolné vůči specifické formě programované buněčné smrti-anoikis. I když nelze podle našich poznatků považovat expresi nukleosteminu v epitelových buňkách za znak kmenovosti, v *in vitro* podmínkách poskytuje důležité informace o fenotypu kultivovaných keratinocytů. Získané výsledky ukazují, že vliv prostředí – tzv. niche - je právě to, co udržuje buňky ve stavu blízkém buňkám kmenovým.
- Na základě experimentálních výsledků byla vyvinuta nová metodika kultivace a přenosu keratinocytů na polymerním nosiči. Ve srovnání s klasickou metodou kultivace konfluentních epidermálních štěpů uchycených na textilním nosiči přináší tato metoda mnohé výhody. Dochází ke zkrácení doby potřebné pro přípravu štěpů, odpadá také enzymatické odvolnění buněk, které negativně ovlivňuje jejich viabilitu. Zejména jsou však buňky po aplikaci na

rannou plochu kryty hydrogelovým nosičem, který je chrání před vniknutím infekce a vyschnutím a vytváří vhodné mikroklima pro dobré přihojení a rozrůstání transplantovaných buněk. Tyto štěpy byly využity k léčbě 19 pacientů s kožními ztrátami.

Výzkumné cíle vytyčené v této disertační práci byly splněny. Přesto zbývá ještě mnoho problémů, které je nutno vyřešit, než bude vytvořena kožní náhrada, která bude rutinní pomůckou k léčbě kožních ztrát. Výsledky našich studií přispívají i k lepšímu poznání nádorů vycházejících z epitelů.

5. SOUHRN

Kůže je největším orgánem lidského těla a její poškození ve velkém rozsahu může způsobit smrt pacienta.Vzhledem k nemožnosti alotransplantace kůže je léčba rozsáhlých kožních ztrát (zejména v důsledku popálení) velmi náročná a zdlouhavá. V předložené práci jsem se soustředila na stanovení glykobiologických charakteristik dlaždicových epitelů, zejména kůže, za normálních a patologických podmínek. Ty by mohly sloužit jako podklad pro nové metody kultivace keratinocytů pro klinické užití. Epidermis sice byla první lidskou tkání, která byla v laboratoři připravena a vrácena pacientovi, výsledky těchto přenosů jsou však problematické. K přípravě fungující tkáňové náhrady je nutná podrobná znalost funkčních vlastností používaných buněk. V pracích, které jsou součástí této disertace, jsem se věnovala studiu exprese galektinů a jejich glykoligandů. Důvodem tohoto zaměření je velký význam galektinů pro biologické děje a minimální znalosti o výskytu těchto molekul v kůži. Zjistili jsme, že vazba galektinu-3 je v podmínkách *in vivo* i *in vitro* citlivým fenotypovým znakem diferenciace epidermálních buněk (zdravých i nádorových), což by mohlo být využito zejména k patologickému hodnocení prognózy nádorového onemocnění. Naproti tomu námi zjištěná jaderná exprese galektinu-1 u kultivovaných epidermálních buněk – keratinocytů - ukazuje, že se jedná o buňky blízké buňkám kmenovým. To by mohlo být důležité pro kultivaci těchto buněk pro terapeutické účely. Zcela nové poznatky přineslo studium exprese galektinu-2 v jádrech buněk vystavených stresu a jeho akumulace v PML jaderných tělískách. Prokázali jsme rozdílný fenotyp dlouhodobě kultivovaných keratinocytů získaných z interfolikulární epidermis a z vlasových folikulů. Na krátkodobé expresi kmenového znaku keratinu 19 jsme dokázali, že za *in vitro*

podmínek může vnější podnět (ztráta a opětovné získání adheze) navodit kmenové vlastnosti epidermální buňky. Získané výsledky tak dokazují, že vliv prostředí – tzv. niche - je právě to, co udržuje buňky ve stavu blízkém buňkám kmenovým. V současné době hledáme způsob, jak takovéto podmínky *in vitro* vytvořit.

Byla vyvinuta nová metodika kultivace a přenosu keratinocytů na polymerním nosiči. Tento způsob přípravy epidermálních štěpů přináší některé výhody oproti souvislému porostu keratinocytů mechanicky uchycenému na textilním nosiči. Jedná se zejména o zkrácení doby potřebné pro přípravu štěpů a vynechání enzymatického odvolnění buněk, které negativně ovlivňuje jejich životaschopnost. Především však jsou buňky po aplikaci na rannou plochu chráněny před infekcí a vyschnutím hydrogelovým nosičem. Tím je vytvořeno vhodné mikroprostředí pro zdárné přihojení a rozrůstání transplantovaných buněk. Tyto štěpy byly již použity i v klinické praxi s velmi dobrými výsledky zejména u popálených pacientů.

6. SUMMARY

The skin is the largest organ of human body and its severe damage can cause even death of a patient. As the allografting of skin can not create permanent closure of wounds, the treatment (especially in cases of burn injuries) is rather demanding and prolonged. In my work I focused on determination of glycobiologic characteristcs of squamous cell epithelium, especially the skin, under normal and pathological conditions. Those results which we have obtained could be used for development of new methods of keratinocyte cultivation for clinical purposes. Epidermis was the very first human tissue that was prepared *in vitro* and returned back to the patient however the results of these transplantations were not satisfactory. The detailed knowledge of functional nature of transplanted cells is necessary to prepare really effectual tissue replacement. In the articles used in my thesis I dwell on expression of galectins and their glycoligands.

Galectins play an important role in different biological processes however the knowledge about their incidence in the skin is minimal so far. We found out that the bond of galectin-3 under *in vivo* and *in vitro* conditions is a sensitive phenotypic marker of differentiation of epidermal cells. It could be employed mainly in the pathological estimation of the squamous cell carcinoma prognosis. On the other hand we determined that the cultured keratinocytes expressing galectin-1 in their nuclei posses some stem cell features. It could play an important role in the cultivation of keratinocytes for therapeutical purposes. We obtained completely new data concerning expression of galectin-2 in the nuclei of keratinocytes and fibroblasts cultured under stress conditions and its accumulation

in PML nuclear bodies. We demonstrated the different phenotype in the long-term cultured interfollicular and hair follicle keratinocytes.

Following the transient expression of the epidermal stem cell marker keratin 19 we substantiated that an external impuls (loss of adhesion and re-adhesion) can induce stemness of epidermal cells during *in vitro* cultivation. It could be concluded that the microenvironment – so called niche – influences the maintainance of the cells in the stem cell-like status. We continue in our study searching how to create such conditions *in vitro*.

A new method of cultivation and transfer of keratinocytes on polymer support was developed. This way of cultivation of epidermal grafts exhibits some advantages compared with confluent sheets attached to textile. Namely the shortening of the cultivation period and the deletion of enzymatic detachment of the cells, that negatively influence their viability, are the main benefits. First of all the hydrogel support protects the cells from infection and desiccation after its application to the wound bed. So the optimal microclimate for the attachment and spreading of transplanted cells is created. These grafts were already used in clinical field with rather good results, namely in burned patients.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Barondes S.H., Castronovo V., Cooper D.N.,Cummings R.D., Drickamer K., Feizi T., Gitt M.A., HirabayashiJ., Hughes C., Kasai K. et al: Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76: 597-598, 1994

Braun KM., Niemann C., Jensen UB., Sundberg JP., Silva-Vargas V., Watt F: Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* 130: 5241-5255, 2003

Carrel A., Burrows M.T.: Cultivation of adult tissues and organs outside the body. *JAMA* 55: 1379-1384, 1910

Colnot C., Ripoche M.A.,Scaerou F., Fowlis D., Poirier F.: Galectins in mouse embryogenesis. *Biochem. Soc. Trans* 24: 141-146, 1996

Commo S., Gaillard O., Bernard BA:The human hair follicle contains two distinct K19 positive compartments in the outer root sheath: a unifyinghypothesisfor stem cell reservoir? . *Differentiation* 66: 157-164, 2000

Cotsarelis G., Sun, T. T., Lavker R. M.: Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61: 1329-1337, 1990

Daley JP, Hawley-Nelson P., Epstein DA: Growth of human epidermal keratinocytes in keratinocyte serum-free medium. *Focus* 12: 68-71, 1990

De Luca M, Bondanza S, Cancedda R, Tamisani AM, Di Noto C, Muller L, Dioguardi D, Brienza E, Calvario A, Zermani R, et al.: Permanent coverage of full skin thickness burns with autologous cultured epidermis and reepithelialization of partial skin thickness lesions induced by allogeneic cultured epidermis: a multicentre study in the treatment of children. *Burns,* 18, Suppl.1: S16-19, 1992

Elliott M, Vandervord J: Initial experience with cultured epithelial autografts in massively burnt patients. *ANZ J Surg* 72: 893-895, 2002

Fuchs E..: Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell. Biol.* 111: 2807-2814, 1990

Gabius H-J: Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 243: 543-576, 1997

Green H, Kehinde O, Thomas J.: Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 (11): 5665-5668, 1979

Grinnell F, Feld MK: Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem* 257(9): 4888-4893, 1982

Halata Z, Grim M, Bauman KI: Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 271(1): 225-239, 2003

Harkin DG, Dawson RA, Upton Z: Optimized delivery of skin keratinocytes by aerosolization and suspension in fibrin tissue adhesive. *Wound Repair Regen* 14(3): 354-363, 2006

Herson MR, Mathor MB, Altran S, Capelozzi VL, Ferreira MC: In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. *Artif Organs* 25(11): 901-906, 2001

Hickerson WL, Compton C, Fletchall S, Smith LR.: Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent burn coverage. *Burns,* 20, Suppl.1: S52–55, 1994

Jensen U. B., Lowell S., Watt F. M.: The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development* 126, 2409–2418, 1999

Kaiser HW, Stark GB, Kopp J, Balcerkiewicz A, Spilker G, Kreysel HW: Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS-allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique). *Burns* 20(1): 23-29, 1994

Kanitakis J.: Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* 12: 390-401, 2002

Karasek M., Charlton M.E.: Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *J. Invest. Dermatol.* 56: 205-212, 1971

Königová R. et al.: Komplexní léčba popálenin, str. 67-124 Grada (Praha, ČR) 1999 ISBN 80-7169-416-9

Koster M.I., Kim S., Mills A.A., DeMayo F.J., Roop D.J.: p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* 18: 126 – 131, 2004

Langer R. and Vacanti J.P.: Tissue engineering. *Science* 260, 920-926, 1993

Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., West M.: *Handbook of stem cells*, s. 27- 30, USA, Elsevier, 2004

Leffler H., Carlsson S., Hedlund M., Qian Y., Poirier F.: Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal* 19: 433-440, 2004

Liu F-T, Patterson R.J., Wang J.L.: Intracellular functions of galectins. *Biochimica at Biophysica Acta* 1572: 263-273, 2002

Matouskova E, Vogtova D, Königova R: A recombined skin composed of human keratinocytes cultured on cell-free pig dermis. *Burns* 19(2): 118-123, 1993

Medawar P.B.: The cultivation of adult mammalian skin epithelium in vitro. *Q. J. Micros. Sci.* 89: 187-192, 1948

Michel M., Tőrők N., Godbout M.-J., Lussier M., Gaudreau P., Royal A., Germain L.: Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expessing cells are differentially localized in function of anatomic sites and their number varies with donor age and culture stage. *J. Cell. Sci.* 109, 017-1028, 1996

Morris, R. J., Potten C.S.: Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells *in vitro*. *Cell Proliferation* 27: 279 – 289, 1994

Muehleman C, Wise RD: Epidermal culture and grafting. A brief review. *J Am Podiatr Med Assoc* 83(8): 462-465, 1993

Myers SR, Grady J, Soranzo C, Sanders R, Green C, Leigh IM, Navsaria HA: A hyaluronic acid membrane delivery system for cultured keratinocytes: clinical "take" rates in the porcine kerato-dermal model. *J Burn Care Rehabil* 18(3): 214-222, 1997

Nerem R.M. and Sambanis A.: Tissue engineering: From biology to biological substitutes. *Tissue Eng.* 1: 3-13, 1995

O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegal S, Kehinde O, Green H: Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1: 75-78, 1981

Pandya AN, Woodward B, Parkhouse N.: The use of cultured autologous keratinocytes with integra in the resurfacing of acute burns. *Plast Reconstr Surg* 102: 825-828, 1998

Plzák J, Betka J, Smetana K Jr, Chovanec M, Kaltner H, André S, Kodet R, Gabius HJ: Galectin-3 - an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer* 40(15): 2324-2330, 2004

Plzák J, Smetana K Jr, Betka J, Kodet R, Kaltner H, Gabius HJ.: Endogenous lectins (galectins-1 and -3) as probes to detect differentiation-dependent alterations in human squamous cell carcinomas of the oropharynx and larynx. *Int J Mol Med* 5(4): 369-372, 2000

Saal I, Nagy N, Lensch M, Lohr M, Manning JC, Decaestecker, C, Andre S, Kiss R, Salmon I, Gabius H-J: Human galectin-2: expression profiling by RT-PCR/immunohistochemistry and its introduction as a histochemical tool for ligand localization. *Histol Histopathol* 20: 1191-1208, 2005

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J: The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123: 513-522, 1993

Seery J.P.: Stem cells of the esophageal epithelium. *J Cell Sci* 115: 1783-1789, 2002

Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V.: Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn* 231: 258-269, 2004

Sijin L, Ziwei C,Yajun L, Meiyu D, Hongwei Z, Guofa H et al.: The effect of knocking-down nucleostemin gene expression on the *in vitro* proliferation and *in vivo* tumorigenesis of HeLa cells. *J Exp Clin Cancer Res* 23: 529-538, 2004

Tsai RYL, McKay RDG: A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Gene Develop* 16: 2991-3003, 2002

Tsang MW, Wong WK, Hung CS, Lai KM, Tang W, Cheung EY, Kam G, Leung L, Chan CW, Chu CM, Lam EK.: Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 26(6):1856-61, 2003

Uchi H., Terao H., Koga T., Furue M.: Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol Sci* 24: S29-S38, 2000

Villalobo A., Gabius H-J.: Signaling pathways for transduction of the initial message of the glycocode into cellular responses. *Acta Anat.* 161: 110-129, 1998

Wang JL, Gray RM, Haudek KC, Patterson RJ: Nucleocytoplasmic lectins. *Biochim Biophys Acta* 1673: 75-93, 2004

Watt F, Jordan PW, O'Niel CH: Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(15):5576-5580,1988

Waugh HV, Sherratt JA: Modeling the effects of treating diabetic wounds with engineered skin substitutes. *Wound Repair Regen* 15(4):556-65, 2007

Webb A, Li A, Kaur P: Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 72: 387-395, 2004

Yamaguchi Y, Itami S, Tarutani M, K, Hosokawa K, Miura H, Yoshikawa K: Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epitheial-mesenchymal ineractions. *J Invest Dermatol* 112: 483-488, 1999