

v pozici  $\alpha 2,3$  vazbě galektinu nebrání. Tato skutečnost by mohla být klinicky důležitá, protože vysvětluje i větší mobilitu nádorových buněk a tím i jejich větší ochotu metastazovat.

Dále jsme studovali výskyt Gal-2 v jádře u pěti různých typů fibroblastů a dvou typů keratinocytů (zdravých a nádorových). Buňky byly kultivovány za normálních podmínek nebo vystaveny stresu. 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. Také netransformované fibroblasty ze stromatu bazaliomu jsou rezistentní vůči stresu. Naproti tomu po transformaci těchto fibroblastů (vlivem dlouhodobé kultivace) lze stanovit Gal-2 v jádrech všech buněk. Vzhledem k tomu, že nedochází ke kolokalizaci s proteinem SC35, je pravděpodobné, že se Gal-2 na sestřihu pre-mRNA nepodílí. Skutečnost, že Gal-2 nebyl nikdy přítomen v jádrech dělicích se buněk (Ki67 pozitivních) nás vedla k domněnce, že je exprimován především v nedělicích se buňkách. Výsledky získané u fibroblastů ze stromatu bazaliomu po jejich transformaci 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.

## 5.2. Charakteristika epidermální kmenové buňky *in vitro*

Srovnávali jsme populaci keratinocytů izolovaných z interfolikulární epidermis s epidermálními buňkami izolovanými z vlasového folikulu. Kultura keratinocytů izolovaných z vlasového folikulu se vydrží dít mnohem déle než kultura připravená z interfolikulární epidermis. Zatímco buňky z interfolikulární epidermis končí svůj růst ve stádiu terminální diferenciace, kultura z vlasového folikulu ve stádiu proliferační senescence.

Dále bylo zjištěno, že buňky pozitivní na protein  $\Delta Np63$ , tedy epidermální kmenové buňky či buňky jim blízké, exprimují v jádrech endogenní lektin Gal-1 a

epitopy rozpoznávané tímto galektinem, ne však Gal-3. 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. Navíc se zdá, že proliferující buňky stratum basale včetně buněk kmenových obsahují na svých povrchích oligosacharidové řetězce s terminálně vázanou kyselinou N-acetylneuraminovou v pozici  $\alpha 2,6$ , což umožňuje jejich migraci.

Jak již bylo zmíněno výše, exprese keratinu 19 a vazebná místa pro vazbu Gal-1 v jádře jsou znaky, které mohou charakterizovat epidermální kmenovou buňku (Commo et al., 2000). V postnatálním období se keratin 19 vyskytuje pouze u populace keratinocytů ve vlasovém folikulu. *In situ* také keratinocyty basaliomu, nádoru který vzniká ve vlasovém folikulu, jsou u některých pacientů pozitivní při průkazu keratinu 19. 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. Jedná se o velmi malé buňky (10  $\mu\text{m}$ ), které jsou bohaté na přítomnost  $\beta 1$  integrinu a mají v jádře vazebná místa pro Gal-1. Navíc jsou tyto buňky schopny přežít 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 mikroprostředí (niché), které by její kmenový charakter udrželo. Buňky získané z vlasového folikulu mají tytéž rozměry, jsou též bohaté na  $\beta 1$  integrin, avšak exprese keratinu 19 při kultivaci u nich přetrvává déle. To je ve shodě s *in vivo* podmínkami. Nicméně exprese keratinu 19 za *in vitro* podmínek 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.

V souvislosti s kmenovými znaky jsme se zaměřili i na nukleostemin, jehož výskyt je popsán jak pro kmenové buňky nervové a hematopoietické, tak nádory z nich vycházející (Tsai et McKay, 2002; Sijin et al., 2004). Tento protein migruje mezi jadérky a nukleoplasmou a kontroluje proces proliferace a nástup apoptózy. V lidské epidermis se však *in situ* vyskytuje nejen u všech buněk bazální vrstvy, ale

těž u buněk postmitotických (keratin 10 pozitivních), tedy v oblasti, kterou dříve anatomové označovali jako stratum germinativum. 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 jádřích. Nepřítomnost fibroblastů v kultivačním systému způsobila výraznou redukci přítomnosti nukleosteminu; interfolikulárními keratinocyty nebyl produkován nikdy. To je ve shodě s poznatkem, že epitel-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.

### 5.3. Kultivace keratinocytů na polymerním nosiči

Vyvinuli jsme metodiku kultivace keratinocytů na hydrogelovém nosiči z poly(2-hydroxyetyl metakrylátu), tzv. polyHEMA, který je používán na výrobu kontaktních čoček. PolyHEMA má výhodné mechanické vlastnosti, je však obtížně kolonizován buňkami (Watt et al., 1988). 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. 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 svoji polarizaci a kolonizovat experimentální rannou plochu. Zde tvoří nové kolonie, které mají dobrý proliferační potenciál (exprese PCNA a Ki67). Tyto buňky také exprimují  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  a  $\alpha 5\beta 1$  integrinové řetězce, které jsou charakteristické pro keratinocyty bazální vrstvy a objevují se *in vivo* v průběhu spontánního hojení rány z okrajů. Při dlouhodobé

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Exprese galektinů kožními buňkami *in vivo* a *in vitro*

Ve vícevrstevných dlaždicových epitelech hrají významnou roli zejména Gal-1, Gal-3 a Gal-7. Přítom 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. Úroveň jaderné exprese Gal-1 a jeho vazebných míst v jádře vypovídá o stavu diferenciaci keratinocytů a její výskyt lze podle našich výsledků u kultivovaných keratinocytů považovat za znak kmenovosti. Naproti to Gal-3 a jeho reaktivní epitopy se vyskytují převážně suprabazálně, v již diferencovaných postmitotických buňkách, u kterých nebyla nalezena exprese Ki-67 (znak buněčné proliferace) ani  $\beta 1$  řetězců integrinových receptorů. Expese vazebných míst pro Gal-3 se vyskytovala pouze u keratin 10 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 pevnosti mezibuněčných spojení. U kultivovaných lidských keratinocytů byly buňky s vazebnými místy pro Gal-3 umístěny ve středu kolonií, obklopené buňkami pozitivními na  $\beta 1$  integrin a Ki-67. Tato situace je obdobná jako u nádorů dlaždicových epitelů, kde exprese epitopů reaktivních pro Gal-3 se vyskytuje u diferenciováných buněk v centru nádoru. Glykosylační profily stanovené pomocí vazby Gal-3 jsou citlivým fenotypickým znakem diferenciaci epidermálních buněk, což by mohlo být využito zejména v histopatologické diagnostice nádorů hlavy a krku (Plzák 2004) Málo diferenciované buňky těchto nádorů jsou charakterizovány expresí kyseliny sialové v poloze  $\alpha 2,6$ ; naproti tomu diferenciované buňky jsou pozitivní pro kyselinu  $\alpha 2,3$  sialovou. Kolokalizační studií na úrovni jedné buňky bylo zjištěno, že zatímco  $\alpha 2,6$  navázaná sialová kyselina maskuje celý cukerný epitop a brání vazbě galektinu-3, sialová kyselina

Lidské dermální fibroblasty, fibroblasty ze stromatu bazocelulárního karcinomu a linie LEP<sub>19</sub> byly kultivovány v mediu DMEM s 10% fetálního bovinního séra při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Pro linii nádorových keratinocytů FaDu bylo použito medium EMEM s 10% fetálního bovinního séra při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.3. Histochemické metody

V práci byly využity tři základní histochemické metody.

**Imunohistochemie:** Galektiny -1, -2, -3 a -7 a C-lektin Langerin byly detekovány použitím specifických protilátek prvního kroku. Ke znázornění cytokeratinového skeletu jako znaku diferenciacie epitelových buněk byly použity monoklonální protilátka proti keratinu 10, 19 a monoklonální protilátka LP-34. Pomocí příslušných monoklonálních protilátek byla sledována exprese desmogleinu, desmoplakinu 1 a involucrinu. Ke stanovení jaderných znaků byly použity protilátky prvního kroku proti PCNA, Ki-67, ΔNp63, SC35 a nukleosteminu. Dalšími použitými monoklonálními protilátkami byly protilátky proti α2, α3 a α5β1 řetězcům integrinového receptoru a dále protilátky proti proteinům bazální membrány – kolagenu IV a lamininu.

**Lektinová histochemie:** K detekci lektinových glykoligandů byly použity jak exogenní rostlinné lektiny (*Dolichos biflorus* aglutinin), tak lektiny endogenní (galektiny-1, -3, -7, Langerin).

**Reverzní lektinová histochemie:** Tato metoda používající jako próby neoglykokonjugáty (manosa-BSA-biotin [BSA = hovězí sérový albumin], sacharid krevní skupiny A-pAA-biotin [pAA = poly-2-hydroxyethyl-akrylamid]) zobrazila endogenní vazebná místa pro příslušné sacharidové motivy.

K vizualizaci proběhlých histochemických reakcí byly užity nepřímé fluorescenční metody s výhodou násobného značení. Vyhodnocení bylo prováděno pomocí počítačového analyzačního systému LUCIA GF Magic, který dovoluje podrobnější zpracování získaného obrazu včetně měření profilu fluorescenčních intenzit.

Podrobně jsou veškeré postupy a podmínky experimentů popsány v našich publikacích, uvedených na konci autoreferátu.

kultivaci jsou buňky schopné tvořit stratifikovaný porost a diferencovat (produkce involucrinu a keratinu 10). Tyto štěpy byly s úspěchem použity v klinické praxi.

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 přihojení aplikovaného štěpu a zároveň je tato skutečnost nepříznivá i z hlediska bezpečnostního (priony?). Za použití lektinové a reverzní lektinové histochemie při studiu lidské kůže jsme zjistili, že vazba keratinocytů k lamininu je kromě dalších typů receptorů realizována i prostřednictvím lektinů rozpoznávajících manózu. Keratinocyty dobře adherovaly na kultivační povrch potažený syntetickými neoglykoproteiny obsahujícími manózu i za nepřítomnosti podpůrných buněk. Později byly manosidy kovalentně navázány i na hydrogelový nosič (polyHEMA či jeho kopolymery). Takto je možno kultivovat keratinocyty i bez přítomnosti podpůrných buněk na bioaktivním nosiči s imobilizovanou manózou. Tento princip imobilizace látek, specificky rozpoznávaných jednotlivými buňkami, na polymerní nosič by bylo možno využít zejména při *in vitro* výzkumech jednotlivých buněčných populací.

### 5.4. Využití kultivovaných keratinocytů k léčbě kožních ztrát

Keratinocyty kultivované na polymerním nosiči byly použity k léčbě 19 pacientů s popáleninovým úrazem a 13 pacientů s trofickými defekty. U popálených pacientů se jednalo o popáleniny II. a III. stupně a o odběrové plochy. Plocha aplikovaných štěpů byla 10 až 500 cm<sup>2</sup> 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 nekrektovanou až na fascii prokázala, že autologní keratinocyty přenesené na hydrogelovém nosiči 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. Po dvou letech plocha nejevila známky jizvení, histologický a imunohistochemický profil byl shodný se zdravou kůží. Byla dokonce prokázána přítomnost Langerhansových buněk.

Dvě třetiny pacientů s trofickými defekty trpěly cukrovkou, a proto byla léčba velmi obtížná. K léčbě byly využívány jak keratinocyty autologní, tak často i 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. Prokázali jsme, že keratinocyty kultivované na polymerním nosiči jsou velmi dobrým krytem zejména pro léčbu traumatických kožních ztrát. V případě chronických trofických defektů, kde jsou přidruženy i další komplikace jako angiopatie a neuropatie, je však i tato léčba málo účinná.

## **4. MATERIÁL A METODY**

### **4.1. Použitý biologický materiál**

Pro kultivaci autologních keratinocytů byl odebírán jemný dermo-epidermální štěp cca 5 cm<sup>2</sup>. Pro kultivaci alogenních keratinocytů, experimentální kultivace i kožní řezy byla využívána zbytková kůže z plastických operací na Klinice plastické chirurgie FNKV v Praze 10. 20 vzorků bazocelulárního karcinomu bylo získáno od pacientů v rámci chirurgického řešení, které tito nemocní podstoupili na Kožní klinice VFN v Praze 2. Všechny vzorky tkáně byly odebrány s informovaným souhlasem pacienta. Kožní vzorky byly enzymaticky (0,3% roztok trypsinu) rozvolněny na dermis a epidermis. Z epidermis byla získána primární kultura interfolikulárních keratinocytů, z dermis kultura folikulárních keratinocytů a fibroblastů. Ze vzorků bazocelulárních karcinomů byly připraveny primokultury stromálních fibroblastů. Dále byly pro studie využívány buněčné linie: 3T3 – linie myších embryonálních fibroblastů, LEP<sub>19</sub> – linie lidských embryonálních plicních fibroblastů, FaDu – linie epiteliálních nádorových buněk ze spinocelulárního karcinomu faryngu.

### **4.2. Kultivace buněk**

Keratinocyty byly kultivovány na subkonfluentním porostu podpůrných buněk, 3T3 myších fibroblastů, u kterých byla zastavena proliferace pomocí  $\gamma$ -záření nebo Mitomycinu C. Buňky byly kultivovány v mediu HMEM s 10% bovinního séra a s přidavkem epidermálního růstového faktoru, cholera toxinu, insulinu a hydrocortisonu při 37°C a tenzi CO<sub>2</sub> 3,3%. Hydrogelový nosič byl nabotnán 48 hodin ve fyziologickém roztoku a po sterilizaci preinkubován 24 hodin v kultivačním mediu s 25% bovinního séra. Pro přípravu štěpů k léčbě pacientů byly používány keratinocyty ze 2. nebo 3. pasáže. Před aplikací byly zbytkové podpůrné buňky enzymaticky odstraněny (roztokem trypsinu).

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 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).

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. Jako podpůrné buňky se nejčastěji používají myší embryonální fibroblasty (3T3 linie), u kterých je zastavena proliferační schopnost, a to pomocí  $\gamma$ -záření nebo antibiotika Mitomycinu C. Tyto buňky podporují jak adhezi keratinocytů, tak svými metabolity i jejich buněčné dělení. V kultuře proliferují pouze ty keratinocyty, které nejsou terminálně diferencované; největší růstový potenciál vykazují kmenové buňky (De Luca et al., 1992). Opakovaným pasážováním a plošnou expanzí lze v několika týdnech dosáhnout požadované plochy v řádech tisíců až desetitisíců cm<sup>2</sup>. 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.

## 6. 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 diferenciac 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-apoptosis. I když nelze podle našich poznatků považovat expresi nukleostemínu 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 přijetí a rozrůstání transplantovaných buněk. Tyto štěpy byly využity k léčbě 32 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.

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. Bohužel dosud neexistuje jedinečný znak, který by epidermální kmenovou buňku definoval. Potenciální epidermální kmenovou buňku lze charakterizovat kombinací vysoké exprese  $\alpha 6$  integrinu a nízké exprese transferinového receptoru CD71 (Webb et al., 2004). Dalšími možnými znaky epidermální kmenové buňky je exprese specifických cytokeratinů, 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). Keratin 19 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  $\alpha 3\beta 1$  integrin. Dalším možným znakem kmenovosti je protein  $\Delta Np63\alpha$ , který je rozhodující při inhibici terminální diferenciaci zralé epidermis (Koster et al., 2004).

### **3.4. Kultivace keratinocytů pro klinické účely**

Kůže je největším orgánem lidského těla, u dospělého člověka dosahuje plochy 1,6 – 2,0 m<sup>2</sup>. Tvoří ochranný kryt těla, slouží jako vylučovací orgán, podílí se na termoregulaci, obsahuje i velké množství volných nervových zakončení a specializovaných receptorů. Ztráta uvedených funkcí kůže ve velkém rozsahu (termický či mechanický úraz) je závažným, až smrti 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 (Konigová et al., 1999). Vzhledem k tomu,

v průběhu embryonálního vývoje i dospělosti u myši ukázalo, že jednotlivé galektiny jsou tkáňově specifické a vyskytují se v různých obdobích vývoje organismu (Colnot et al., 1996).

### 3.3. Epidermální kmenová buňka

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. Rozeznáváme kmenové buňky embryonální a ty vyskytující se i v tkáních dospělého jedince. Embryonální kmenové buňky lze laboratorně připravit z vnitřní buněčné masy nacházející se v blastocystě. Místo a doba vzniku kmenových buněk dospělého organismu nejsou v průběhu ontogeneze zárodku dosud přesně definovány. Na rozdíl od pluripotentních embryonálních kmenových buněk jsou „dospělé“ multipotentní (zdroj omezeného počtu buněčných typů) či monopotentní (zdroj jediného buněčného typu). Jejich funkční vlastnosti včetně „kmenovosti“ jsou výrazně ovlivněny 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).

Zdrojem nových keratinocytů jsou epidermální kmenové buňky. Probíhá u nich asymetrické dělení, při němž vzniká nová kmenová buňka a tzv. přechodně se dělicí buňka (transit amplifying cell). Epidermální kmenové buňky mají pomalý buněčný cyklus, ale schopnost dělení si zachovávají po celou dobu existence organismu, čímž je umožněna neustálá obnova epidermis. Přechodně se dělicí buňky se dělí velmi rychle, avšak jejich proliferační aktivita je omezena pouze na tři až šest cyklů, takže v konečném důsledku stojí tyto buňky na začátku terminální diferenciaci. Údaje o přesné poloze epidermální kmenové buňky v interfolikulární epidermis se liší. Podle

## 7. 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 glycobiochemical characteristics 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 possess 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.

zářením. Dále zde jsou Langerhansovy dendritické buňky vyskytující se ve stratum spinosum. Dovedou vázat antigen a předkládat ho T-lymfocytům. V nehlubších částech epidermis jsou uloženy Merkelovy buňky, které mají vztah ke kožním receptorům (Halata et al., 2003).

### 3.2. Galektiny

Dlaždicové epitelu jsou stratifikovány nejen morfologicky, ale i funkčně. Této skutečnosti odpovídá i exprese řady molekul (adhezivní molekly, 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. 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, jednou z nich jsou galektiny (Barondes et al., 1994). Galektiny splňují dvě kritéria: váží  $\beta$ -galaktosidy a sekvence jejich cukr-rozpoznávající domény je výrazně homogenní. 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, při 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 (galektin-1,-2,-5,-7,-10,-11,-13,-14) obsahují jednu cukr rozpoznávající doménu, členové druhé skupiny (galektin-4,-6,-8,-9,-12) mají tyto oblasti dvě, a to identické. Třetí skupinu tvoří pouze galektin-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  $\beta$ -galaktosidů je tento galektin schopen rozpoznávat i trisacharidy krevních skupin A a B a poly N-acetyllaktosaminy. Studium exprese galektinů



### 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1. Dlaždicové 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 žláz (potní, mazové, mléčné) a dalších derivátů (vlasy, nehty, zuby). Epitelové buňky mají 3 charakteristické rysy: a) přiléhají těsně jedna ke druhé s minimálním množstvím mezibuněčné hmoty; b) vykazují funkční stejně jako morfoloogickou polaritu (apikální, laterální a basální doména); c) jsou přichycené k bazální membráně, která je tvořena proteiny a polysacharidy. Epitel 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. V předložené disertaci se budeme věnovat vícevrstevnému dlaždicovému epitelu, který je u savců lokalizován na místech, která jsou vystavena 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). Pokožka-epidermis je povrchová část kůže tvořená pěti vrstvami. 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 a organely včetně jader. V keratinocytech jsou produkovány keratiny, které v buňce tvoří intermediární filamenta. Tyto fibrilární proteiny jsou mechanicky odolné, hydrofobní a chemicky nereaktivní. Jednotlivé keratiny jsou exprimovány v závislosti na diferenciálním stupni keratinocytů (Kanitakis, 2002). V hlubokých vrstvách epidermis jsou uloženy pigmentové buňky melanocyty, které chrání bazální vrstvu epidermis před UV

### 8. POUŽITÁ LITERATURA

- Barondes S.H., Castronovo V., Cooper D.N., Cummings R.D., Drickamer K., Feizi T., Gitt M.A., Hirabayashi J., Hughes C., Kasai K. et al: Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76: 597-598, 1994
- 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., Fowles 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 unifying hypothesis for stem cell reservoir? *Differentiation* 66: 157-164, 2000
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

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

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

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

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

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

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

## 2. CÍL PRÁCE

Na základě prvních, ne příliš 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 potvrzují, že řada typů 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 jejich výsledků v klinické praxi.

## 1. ÚVOD

Schopnost regenerace člověka je ve srovnání s fylogeneticky níže postavenými obratlovci omezená. Pokud tedy dojde k rozsáhlému ztrátovému poranění či k nevratnému poškození orgánu, je výlučným terapeutickým přístupem transplantace. V případě ztrátových 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 fatálního 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 vždy transplantace spojena s rozsáhlou imunitní odpovědí příjemce, která může způsobit ztrátu štěpu. Navíc, i když malé, vždy existuje při výkonu riziko přenosu infekce z dárce na příjemce. Především, vzhledem k extenzivnímu nárůstu počtu 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. Jeho cílem je nejen příprava tkání a orgánů, vhodných pro transplantaci, ale i postupy, které urychlují hojení a přestavbu tkání. Těžisko 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. Právě na příkladu transplantace kultivovaných epidermálních štěpů se potvrdilo, jak velmi obtížná je příprava funkční a fungující náhrady *in vitro*. K tomu je potřeba nejen studovat vlastnosti buněk samotných ale i vliv prostředí na jejich funkci vyjádřenou fenotypem. Proto se dlouhodobě zabýváme studiem buněčné biologie dlaždicových epitelů s cílem připravit tkáňové-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.

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

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 glycode into cellular responses. *Acta Anat.* 161: 110-129, 1998

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

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 epithelial-mesenchymal interactions. *J Invest Dermatol* 112: 483-488, 1999

## 9. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

**Impaktované publikace** – jsou vybrány pouze ty publikace, které se vztahují k disertační práci; v závorce je uveden vedle IF i počet citací.

1. Dvořánková, B., Holíková, Z., Vacík, J., Königová, R., Kapounková, Z., Michálek J., Prádný, M., Smetana, K., Jr.: Reconstruction of epidermis by grafting keratinocytes cultured on polymer support-clinical study. *Int. J. Dermatol.* 42: 219-223, 2003 (IF 0,843 6x)

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 (IF1,829 1x)

4. Dvořánková, B., Smetana, K. Jr., Chovanec, M., Lacina, L., Štork, J., Plzánková, 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 (IF 3,190 1x)

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 (IF 0,621 2x)

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 (IF 1,796 14x)

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 (IF 0,351)

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  $\alpha$ 2,6- and  $\alpha$ 2,3-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 (IF 1,924 14x)

9. Chovanec, M., Smetana, K. Jr., Dvořánková, B., Plzánková, 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 (IF 0,709 1x)

## OBSAH

1. ÚVOD	4
2. CÍL PRÁCE	5
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	6
3.1. Dlaždicové epitely	6
3.2. Galektiny	7
3.3. Epidermální kmenová buňka	8
3.4. Kultivace keratinocytů pro klinické účely	9
4. MATERIÁL A METODY	11
4.1. Použitý biologický materiál	11
4.2. Kultivace buněk	11
4.3. Histochemické metody	12
5. VÝSLEDKY	13
5.1. Expres galektinů kožními buňkami <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i>	13
5.2. Charakteristika epidermální kmenové buňky <i>in vitro</i>	14
5.3. Kultivace keratinocytů na polymerním nosiči	16
5.4. Využití kultivovaných keratinocytů k léčbě kožních ztrát	17
6. ZÁVĚR	19
7. SUMMARY	21
8. POUŽITÁ LITERATURA	23
9. PUBLIKAČNÍ ČINNOST	26

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie

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

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia  
biomedicíny na Anatomickém ústavu 1. LF UK v Praze.

Uchazeč: RNDr. Barbora Dvořánková

Školitel: Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.

Oponenti:

Obhajoba disertační práce se koná dne .....v ..... hod  
na Gynekologicko- porodnické klinice 1. LF UK, Apolinářská 18, Praha 2.

S obsahem disertační práce je možno se seznámit na děkanátu 1. LF UK,  
Kateřinská 32, Praha 2.

**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 (IF 0,671 1x)

**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 (IF 3,008 4x)

**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 (IF 2,000 1x)

**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 (IF 2,161)

**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 (IF1,071 7x)

**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 (IF 2,142 1x)

**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 (IF 2,127 20x)

**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 (IF 2,239 8x)

**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 (IF 0,351 2x)

## Patenty

1. Labský, J., Vacík, J., Smetana, K., Jr., Dvořánková, B.: Polymerní nosič pro kultivaci keratinocytů s aktivními sacharidy (Polymer support for cultivation of keratinocytes with active saccharides). Patent č. 292491.
2. Labský, J., Vacík, J., Smetana, K., Jr., Dvořánková, B.: Polymerní nosič pro kultivaci keratinocytů s lapači radikálů (Polymer support for cultivation of keratinocytes with radical scavengers). Patent č. 292570.
3. Labský, J., Vacík, J., Smetana, K., Jr., Dvořánková, B.: Polymerní nosič pro kultivaci keratinocytů (Polymer support for cultivation of keratinocytes). Patent č. 292883.
4. Vacík, J., Jelínková, M., Smetana, K., Dvořánková, B.: Biologicky aktivní kryt rozsáhlých ranných ploch a způsob jeho přípravy (Biologically active cover of extensive wound beds and its preparation). Patent č.: 281269.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



RNDr. Barbora Dvořánková

Glykobiologie dlaždicových epitelů  
*in vivo a in vitro*

Autoreferát disertační práce

PRAHA, 2007