

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**



**Magda Kudrnová**

**Kultivace neurálních kmenových buněk**

**Bakalářská práce**

**HRADEC KRÁLOVÉ**

**2007**

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biologických a lékařských věd

Magda Kudrnová

**Kultivace neurálních kmenových buněk**

Bakalářská práce

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Forma studia: Kombinovaná

Vedoucí práce: MUDr. Dana Čížková, Ph.D.

Hradec Králové

2007

## SOUHRN

Kmenové buňky jsou nadány jedinečnými vlastnostmi, které zahrnují např. schopnost neomezené proliferace a sebeobnovy a schopnost produkce diferencovaných buněk. Díky těmto vlastnostem představují kmenové buňky klíčový element zodpovědný za tvorbu tkání i jejich regeneraci v průběhu života.

Neurální kmenové buňky (NSCs) se vyskytují pravděpodobně nejhojněji v subependymální zóně (SEZ) mozkových komor. Jsou to buňky multipotentní, schopné diferencovat se v neurony, astrocyty a oligodendrocyty. NSCs mohou být izolovány a dlouhodobě kultivovány *in vitro*.

Tato práce popisuje metody izolace a kultivace NSCs při zachování jejich nezralého stavu, vysoké proliferační aktivity a neomezené schopnosti sebeobnovy; zabývá se možnostmi navození diferenciace NSCs a způsoby zpracování kultivovaných buněk pro histologické vyšetření.

Nervová tkáň byla odebrána ze 14ti denních myších embryí a mechanicky rozmělněna na jednotlivé buňky, které byly podle počtu rozděleny do kultivačních nádobek s médiem. NSCs byly udržovány v kultivačním médiu s přidavkem výživných látek, růstových faktorů EGF (epidermální růstový faktor), bFGF (bazický fibroblastový růstový faktor) a antibiotik. Pro zachování jejich nezralého stavu byly přibližně každý 3. den pasážovány. NSCs byly kultivovány buď ve formě monolayeru, kdy buňky rostou na adhezivním povrchu v ploše nebo jako volně plovoucí trojrozměrné mnohobuněčné útvary – neurosféry. Za účelem navození diferenciace byly NSCs udržovány v médiu s přidavkem fetálního telecího séra a bez růstových faktorů. Buňky nebyly pasážovány, pouze bylo podle potřeby vyměňováno médium. Stav kultur NSCs byl pravidelně kontrolován pozorováním v mikroskopu s fázovým kontrastem. V rámci histologického zpracování byly neurosféry fixovány imerzí ve 4% formaldehydu a zality do parafinu. Z parafinových bločků byly zhotoveny řezy silné 6  $\mu\text{m}$ , a dále obarvené hematoxylinem a eosinem byly vyšetřovány ve světelném mikroskopu.

Při studiu neurosfér jsme v průběhu jejich růstu pozorovali spontánní vyzrávání buněk nacházejících se v centrální části v neurony, astrocyty a oligodendrocyty. Tento nálezn dokládá multipotentní charakter neurálních kmenových buněk. Naopak buňky na povrchu si zachovávaly svůj nezralý charakter. Pravidelným pasážováním bylo možné dlouhodobě udržet kulturu nediferencovaných NSCs *in vitro*. Vlivem nedostatku kyslíku a výživných látek některé buňky uvnitř neurosfér podléhaly buněčné smrti; tento fenomén je však přirozenou součástí vývoje.

Neurosféry představují jedinečný trojrozměrný model vývoje nervové tkáně *in vitro*; při tomto způsobu kultivace NSCs lze studovat procesy odehrávající se během vývoje tkání *in vivo*, tj. proliferace, migrace, diferenciací a již zmíněná buněčná smrt. Kultivace neurálních kmenových buněk je v současné době významnou metodou pro výzkum této výjimečné populace buněk. V budoucnosti se pravděpodobně stane součástí tzv. buněčné terapie mnoha onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému.

## SUMMARY

Stem cells have unique properties including abilities of unlimited proliferation, self-renewal and production of differentiated cells. Thanks to these properties, stem cells represent key elements for tissue formation and regeneration during the life. Neural stem cells are probably the most abundant in the subependymal zone of the cerebral ventricles. NSCs are multipotent, able to differentiate into neurons, astrocytes and oligodendroglia. NSCs can be isolated and long-termly cultivated *in vitro*.

This work describes methods of isolation and cultivation of NSCs in their undifferentiated state with their high proliferation activity and unlimited self-renewal. It concerns with possibilities of induction of NSCs differentiation and methods of processing of cultured cells for histological examination.

The nervous tissue was isolated from 14-day-old mouse embryos and mechanically dissociated into individual cells, that were plated on culture dishes according to their number. NSCs were maintained in culture medium enriched with nutrients, growth factors EGF (epidermal growth factor) and bFGF (basic fibroblast growth factor) and antibiotics. For preservation of their undifferentiated state, NSCs were passaged approximately each third day. NSCs were cultured in the form of monolayer, when the cells grew on an adhesive surface, or as freely floating three-dimensional multicellular spheroids – neurospheres. For induction of differentiation, NSCs were maintained in culture medium enriched with fetal bovine serum and without growth factors. The cells were not passaged, only the culture medium was periodically changed. The state of NSCs cultures was regularly controlled by their observing in a microscope with phase contrast. For histological examination, neurospheres were fixed by immersion in 4% formaldehyde and embedded into paraffin. Sections (6  $\mu\text{m}$  thick) were cut from paraffin blocks, then stained with hematoxylin and eosin and examined in a light microscope.

In the growing neurospheres, we observed spontaneous differentiation of cells situated to the centres into neurons, astrocytes and oligodendroglia. This finding demonstrated the multipotent character of neural stem cells. On the contrary, cells localised to the surface of neurospheres maintained their undifferentiated character. Some cells inside of neurospheres underwent a cell death due to lack of oxygen and nutrients, however, this phenomenon is a natural process during development.

Neurospheres represent an unique three-dimensional model of development of the nervous tissue *in vitro*; using the neurosphere assay we can study processes of tissue development *in vivo*, e.g. proliferation, migration, differentiation and cell death. Currently cultivation of neural stem cells has been an important method for research of this unique cell population. In future, it will become a part of cell therapy of many diseases of the central and peripheral nervous system.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Velmi děkuji své školitelce paní MUDr. Daně Čížkové, Ph.D. za její cenné rady, odborné vedení, povzbuzování a pomoc při řešení této práce a zpracování výsledků.

Dále děkuji všem kolegům z Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za technickou spolupráci, ochotnou pomoc a příjemné pracovní prostředí.

Tato práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MŠMT – MSM 0021620820.

## **ZKRATKY**

bFGF – bazický fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor)

CNS – centrální nervový systém

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ED14 – 14. den embryonálního vývoje

EGF – epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)

ES – embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells)

F12 – Nutrient Mixture F12 Ham

FCS – fetální telecí sérum

HBSS – Hank's balanced Salt Solution

LF UK – Lékařská fakulta Univerzity Karlovy

NSCs – neurální kmenové buňky (neural stem cells)

PBS – slaný fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)

PORN - polyornitin

SEZ – subependymální zóna



## OBSAH

1. Úvod .....	11
2. Literární přehled .....	13
2.1. Kmenové buňky .....	13
2.2. Neurální kmenové buňky .....	15
3. Materiál a metody.....	19
3.1. Roztoky, pufrы, fixativa a barviva.....	19
3.2. Laboratorní zvířata .....	21
3.3. Chirurgické techniky .....	21
3.3.1. Anestézie .....	21
3.3.2. Odběr embryonální nervové tkáně .....	21
3.4. Buněčné kultury .....	22
3.4.1. Izolace myších embryonálních buněk mozku .....	22
3.4.2. Dlouhodobé kultivace NSCs .....	23
3.4.3. Diferenciace NSCs .....	24
3.4.4. Barvení a počítání.....	25
3.5. Mikroskopie a fotodokumentace.....	26
3.6. Zpracování neurosfér pro histologické vyšetření.....	26
3.6.1. Fixace .....	26
3.6.2. Odvodnění a prosycení parafínem.....	26
3.6.3. Zalití do parafínových bločků .....	26
3.6.4. Krájení tenkých histologických řezů.....	27
3.6.5. Barvení pomocí hematoxylinu-eosinu .....	27
3.6.6. Zamontování preparátů do montovacího média.....	27
4. Použité laboratorní přístroje a zařízení.....	28
5. Výsledky.....	31
5.1. Kultivace NSCs.....	31
5.2. Obrazová část .....	33
5.2.1. Kultivace ve formě monolayeru .....	33
5.2.2. Kultivace ve formě neurosfér .....	35
5.2.3. Neurosféry vytvářející monolayer.....	37
5.2.4. Diferencované buňky .....	39

5.2.5. Neurosféry po histologickém zpracování.....	42
6. Diskuse.....	46
7. Závěr.....	49
8. Literatura.....	50

## 1. ÚVOD

Izolace, kultivace a následná transplantace neurálních kmenových buněk (NSCs) představují poměrně novou a do budoucna velmi nadějnou metodu léčby mnoha závažných onemocnění. Podstatou této tzv. buněčné terapie je transplantace buněk do těla pacienta s cílem podpořit regeneraci a obnovit funkci postižených tkání.

Způsoby provedení buněčné transplantace i dosažené výsledky jednotlivých studií se do jisté míry liší. Úkolem současného výzkumu je nalezení optimálních postupů ke spolehlivému dosažení žádaného terapeutického účinku.

V poslední době se objevují nové možnosti využití všech kmenových buněk vzhledem k jejich jedinečné vlastnosti – plasticitě. NSCs se v nervové tkáni diferencují v neurony, astrocyty a oligodendrocyty, ale za určitých podmínek jsou schopné tvořit např. buňky hematopoetické nebo myogenní; jsou tudíž plastické. Pro své biologické vlastnosti představují kmenové buňky ideální zdroj buněk pro buněčné transplantace, a pro regenerační a reparační medicínu.

V současné době se transplantace kmenových buněk v klinické praxi omezují na hematopoetické kmenové buňky, ale úspěšné experimenty prováděné na zvířecích modelech naznačují, že buněčnou terapii bude možné aplikovat téměř na všechny orgány těla a lze očekávat její začlenění do léčebných postupů většiny klinických oborů.

Jako první popsali techniku pro kultivaci nativních neurálních prekursorových buněk pomocí stimulace epidermálním růstovým faktorem (EGF) pracovníci Univerzity v Calgary v roce 1992. Právě růstové faktory (EGF-epidermal growth factor a bFGF-basic fibroblast growth factor) udržují NSCs v nediferencovaném stavu. Stimulace těmito faktory navozuje proliferaci NSCs a vede k formování mnohobuněčných sférických útvarů *in vitro*, tzv. neurosfér.

Pracoviště Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové se zaměřilo na problematiku transplantace nervové tkáně v roce 1986. Iniciátorem tohoto výzkumu byl prof. MUDr. S. Němeček, DrSc., jehož záměrem bylo využití transplantátů embryonální nervové tkáně k redukci rozvoje sekundární léze u míšního poranění.

Metodou izolace a kultivace neurálních kmenových nebo prekursorových buněk se začal zabývat prof. MUDr. J. Mokřý, Ph.D. Podařilo se mu zde zavést potřebné detekční metody pro charakteristiku kultivovaných buněk a pořídit přístrojové vybavení pro zřízení laboratoře tkáňových kultur. Cílem jeho práce je nejen kultivace, ale především sledování vlastností buněk *in vitro*, a po jejich transplantaci do tkáně laboratorních zvířat *in vivo*. V současné době se na našem

ústavu kultivují také lidské mezenchymové kmenové buňky, kmenové buňky izolované z dřene lidských zubů a myší hematopoetické kmenové buňky. Zkoumají se jejich biologické vlastnosti, fenotypové znaky, schopnost diferenciacce a některé se využívají k transplantacím do tkáně laboratorních zvířat.

Moje bakalářská práce je popisem a možným návodem jak izolovat neurální kmenové buňky z nervové tkáně myších embryí. Dále je kultivovat a udržovat v nezralém stavu s vysokou proliferační aktivitou; rozmnožit je a udržet v takové kondici, aby bylo možné je využít k dalším výzkumným účelům. Zde můžeme jmenovat právě transplantace při mozkových či míšních lézích, dále i transplantace při neurodegenerativních onemocněních jako jsou např. roztroušená skleróza nebo Parkinsonova choroba.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Kmenové buňky

Kmenové buňky představují jedinečnou populaci, která se svými vlastnostmi zcela odlišuje od všech ostatních buněk v tkáni. Jsou to elementy nezralé, nediferencované, s možností vysoké proliferační aktivity a s neomezenou schopností sebeobnovy (v přehledném článku Mokřý J., 2000).

Organismus vzniká z jediné buňky – zygoty, která vznikla splynutím samčí a samičí gamety. Přestože se zygota nepovažuje za kmenovou buňku, protože není schopna sebeobnovy (jejím dělením se netvoří buňky s ní identické), dává vznik buňkám, které již kmenové jsou. Tyto první kmenové buňky se označují jako totipotentní, tzn. jsou prakticky identické a schopné diferencovat se v jakýkoli buněčný fenotyp. K vývojově nejčasnějším kmenovým buňkám, které se podařilo izolovat a vytvořit z nich linie, patří buňky embryoblastu blastocysty. Tyto buňky kultivované *in vitro* se označují jako ES buňky (embryonic stem cells). V průběhu gastrulace buňky embryoblastu tvoří základy ektodermu, entodermu a mezodermu, jejich kmenové buňky se chovají jako pluripotentní, předurčené k tvorbě tkání vyvíjejících se z daného zárodečného listu. V počátcích organogeneze se z buněk zárodečných vrstev odvozují kmenové buňky tkáňově (orgánově) specifické. Jsou to klíčové elementy pro tvorbu tkání a orgánů při embryonálním a fetálním vývoji.

Během života vykazují různou míru proliferační aktivity a schopnosti sebeobnovy. Velmi aktivní jsou v rostoucím dětském organismu. V dospělých tkáních se chovají jako relativně klidové. Do buněčného cyklu vstupují jen tehdy, je-li potřeba doplnit počet buněk v tkáni na normální hodnotu. Z toho vyplývá, že jsou to klíčové elementy pro udržení tkáňového homeostázy a tkáňové regenerace. Nejlépe patrná je jejich činnost ve tkáních s vystupňovanou fyziologickou obměnou jako např. v epidermis, vlasových folikulech, tenkém střevě a hematopoetickém systému (v přehledném článku Duspivová et Mokřý, 2003).

Možnost vysoké proliferační aktivity souvisí s enzymem telomerázou. Telomeráza dokáže rozeznat a prodloužit tzv. teloméry, což jsou koncové části chromozomů (Alberts et al., 1994). Při každém buněčném cyklu zralých buněk dochází ke zkracování těchto telomér, přičemž DNA polymeráza není schopna tyto terminální úseky chromozomů replikovat. Následkem je omezení počtu buněčných dělení u zralých elementů. Tento mechanismus je pravděpodobně zodpovědný za

stárnutí buněk. Velmi aktivní je telomeráza také v embryonálních a neoplastických buňkách (Greider et Blackburn, 1996).

Produkce diferencovaných elementů a neomezená schopnost sebeobnovy je dána asymetrickým dělením, při kterém z mateřské kmenové buňky vznikají nejen diferencované elementy, ale i buňky s ní naprosto identické. Zatímco u symetrického dělení si obě dceřiné buňky ponechávají plný charakter kmenových buněk a tím se jejich počet v tkáni exponenciálně zvyšuje, princip asymetrického dělení spočívá v zachování takovýchto vlastností pouze u jedné dceřiné buňky, která je totožná s mateřskou buňkou. Druhá dceřiná buňka produkuje terminálně diferencované buňky (Rajaraman et al., 2006).

Oba typy dělení lze nejspíše identifikovat dle orientace dělicího vřeténka buněk v metafázi mitózy. Dochází k nerovnoměrnému rozdělení cytoplazmy a organel (Filip et al., 2006). Tímto mechanismem je dosaženo nevyčerpatelnosti zásoby kmenových buněk.

Kmenové buňky se nacházejí ve všech tkáních a orgánech po celý život, tzn. i v dospělých a stárnoucích tkáních. Jsou zde uchovány v mikroprostředí (tzv. niche), které se s vyžíváním organismů mění, a tak se do určité míry mění i vlastnosti kmenových buněk (embryonální, fetální vs. dospělé) (v přehledném článku Soukup et al., 2005).

V posledních letech se pozornost odborníků zaměřila na studium jedinečné vlastnosti – plasticity kmenových buněk. Plasticitu můžeme popsat jako vzájemnou zastupitelnost orgánově specifických kmenových buněk. V určité tkáni produkuje orgánově specifická kmenová buňka diferencované elementy charakteristické pro danou tkáň. Např. NSCs v mozkové tkáni generují neurony, oligodendrocyty, astrocyty a pravděpodobně i ependymové buňky; jsou tudíž multipotentní. Za určitých podmínek lze takovéto orgánově specifické kmenové buňky přimět k tvorbě elementů, které se v nervové tkáni vůbec nevyskytují, např. k tvorbě hematopoetických (Bjornson et al., 1999) nebo myogenních buněk (Galli et al., 2000).

Plasticita je dána právě mikroprostředím, v němž se tyto buňky nacházejí (Spradling et al., 2001). Toto tzv. niché má v různých tkáních odlišné složení. Je tvořeno především podpůrnými a vazivovými buňkami a také mezibuněčnými složkami (bazální membrána, extracelulární matrix). Niché pomáhá udržovat kmenové buňky v nediferencovaném stavu a ovlivňuje produkci diferencovaných elementů. Pokud tkáňově specifická kmenová buňka opustí své původní niché, přestane jím být determinována a získává schopnost tvořit i jiné typy buněk. Může vcestovat do jiného prázdného niché, kde dojde vlivem odlišného prostředí k jejímu přeprogramování tak, že začne produkovat nové typy buněk charakteristické pro novou příslušnou tkáň. Počet niché se mění, mohou zanikat i vznikat. Jsou ovlivňována řadou exogenních i endogenních faktorů (např.

chronickou iritací). Ty je mohou změnit a tím vystavit endogenní kmenové buňky odlišné situaci, což může vést k narušení tkáňové homeostázy (v přehledném článku Duspivová et Mokry, 2003).

Poznatky o plasticitě kmenových buněk zřejmě výrazně ovlivní metodu buněčné terapie. Díky této vlastnosti by bylo možné odebrat od pacienta nebo vhodného dárce kmenové buňky určitého typu, tyto elementy kultivovat *in vitro* a přimět je k produkci požadovaných buněk a ty posléze transplantovat pacientovi. Mezi dospělé orgánově specifické kmenové buňky, které by mohly být použity (respektive se již používají) v buněčné terapii, patří hematopoetické, neurální a stromální (z kostní dřeně) kmenové buňky.

## 2.2. Neurální kmenové buňky

Zralá neurální tkáň byla dlouhou dobu považována za neschopnou sebeobnovy nebo strukturální remodelace. Ale v posledních desetiletích se neočekávaně prokázala přítomnost kmenových buněk v CNS. Tyto NSCs se vyskytují pravděpodobně nejhojněji v subependymální zóně mozkových komor. Zde probíhá neurogeneze v dospělosti nejintenzivněji (Gritti et al., 2002).

Dospělé NSCs splňují všechna kritéria pro zařazení mezi orgánově specifické kmenové buňky. Mohou být izolovány a dlouhodobě kultivovány *in vitro*. Kultivační médium musí obsahovat růstové faktory EGF a bFGF, které stimulují buněčnou proliferaci. V případě, že jsou vysety na povrch potažený polyornitinem nebo lamininem, rostou ve formě monolayeru. Pokud jsou NSCs pěstovány na neošetřeném povrchu, vytvářejí trojrozměrné sféroidy, tzv. neurosféry. Neurosféra, která vzniká proliferací jediné kmenové buňky, je tvořena jednak kmenovými buňkami, jednak více diferencovanějšími neurálními buňkami, přičemž kmenové a progenitorové buňky tvoří povrchovou vrstvu. Následnou disociací těchto útvarů na jednotlivé buňky a jejich další kultivací vzniknou z každé kmenové buňky další neurosféry a počet kmenových buněk se pasážírováním exponenciálně zvyšuje. NSCs lze tímto způsobem kultivovat neomezeně dlouho (Mokry, 1999).

NSCs jsou buňky multipotentní, schopné diferencovat ve zralé neurální elementy a to v neurony, oligodendrocyty, astrocyty a pravděpodobně i v buňky ependymové. Proces diferenciací v určitý zralý buněčný typ je řízen epigenetickými signály (v přehledném článku Duspivová, 2003).

Růstové faktory (EGF a bFGF) udržují NSCs v nediferencovaném stavu. Stimulace těmito faktory navozuje proliferaci NSCs a vede k formování mnohobuněčných sférických útvarů *in vitro*, tzv. neurosfér. Jestliže tyto faktory buňkám nedodáme a přidáme sérum, dochází k diferenciaci

NSCs v subpopulaci neuronů, oligodendrocytů, astrocytů a pravděpodobně i ependymových buněk.

Neurony (nervové buňky) jsou nezávislé anatomické a funkční jednotky se složitou morfologickou charakteristikou, které jsou zodpovědné za příjem, přenos a zpracování podnětů; spouštění různých buněčných aktivit a uvolňování neurotransmiterů i jiných informačních molekul. Skládají se ze tří částí: buněčného těla, dendritů a axonu. Dendrity jsou mnohočetné dlouhé výběžky specializované na příjem podnětů z prostředí, zprostředkovaných senzoryckými epitelovými buňkami, či od jiných neuronů. Axon je výběžek jediný, který je specializovaný na vedení nervových vzruchů k jiným buňkám (nervovým, svalovým a žláznovým). Distální část axonu je zpravidla rozvětvena a vytváří telodendrion. Každá z větví končí na následující buňce na knoflíkovitých rozšířeních zvaných butony, které jsou částí synapse. Velikost i tvar neuronů a jejich výběžků jsou velice pestré (tvar buněčného těla: kulovitý, vejčitý, pyramidální, tvar mnohostěnu). Neurony se dělí podle funkce na motorické, senzorycké a interneurony (Junqueira et al., 1997).

Oligodendrocyty jsou relativně malé kulovité buňky s jedním kulatým jádrem s nečetnými krátkými výběžky. Jsou obsaženy jak v šedé, tak i v bílé hmotě mozku a míchy. Satelitní oligodendrocyty se nacházejí v šedé hmotě poblíž těl neuronů, na které mají trofický a metabolický vliv. Interfascikulární oligodendrocyty jsou v bílé hmotě uspořádané podél axonů, kolem kterých vytvářejí myelinovou pochvu. Jeden oligodendrocyt se může podílet na myelinizaci více axonů. Jsou pravděpodobně nezbytné pro zachování životních funkcí neuronů (Junqueira et al., 1997).

Astrocyty představují hlavní podpůrný element neuronů v CNS. Jsou to buňky hvězdicovitého tvaru, s jedním kulatým jádrem umístěným centrálně a četnými dlouhými výběžky. Mnohé z jejich výběžků jsou v kontaktu s krevními cévami a s pia mater pomocí rozšířených gliálních nožek. Těmi kompletně obklopují krevní cévy v CNS a podílejí se tak na hematoencefalické bariéře. Jistou měrou se podílejí na vytváření opěrného systému nervové tkáně. Některými výběžky jsou v kontaktu s neurony. Po poranění tkáně CNS proliferují a vytvářejí v místě defektu gliovou jizvu. Dělí se na plazmatické, které se vyskytují v šedé hmotě mozku a míchy, a fibrilární nacházející se především v bílé hmotě (Junqueira et al., 1997).

Ependymové buňky se odvozují z vnitřní výstelky neurální trubice a zachovávají si, na rozdíl od jiných buněk stejného původu, které vysílají výběžky a mění se na neurony či glii, původní epiteloidní uspořádání. Ependym vystýlá centrální dutiny mozku a míchy. Je opatřen pohyblivými řasinkami, které podporují tok mozkomíšního moku. Některé ependymové buňky jsou opatřeny dlouhými výběžky, které pronikají hluboko do přilehlé nervové tkáně (Junqueira et al., 1997).



V poslední době proběhlo množství experimentů dokládajících plasticitu NSCs, ale i prekurzorových buněk kostní dřeně, stromálních buněk kostní dřeně a svalových prekurzorů. Přehled nejdůležitějších z nich uvádí tab. 1.

<b>Zdroj</b>	<b>Získaný fenotyp</b>
Hematopoetické kmenové buňky	myogenní buňky
	gliové buňky
	hepatocyty
Stromální buňky kostní dřeně	pneumocyty
	astrocyty
Svalové prekurzory	osteoblasty
	adipocyty
Neurální kmenové buňky	hematopoetické buňky
	myogenní buňky
	hepatocyty
	buňky střevní výstelky
	kardiomyocyty
	buňky mesonefros

Tab.1: Přehled buněčných zdrojů a jejich získaných fenotypů.

Schopnost konverze NSCs v buňky hematopoetické linie doložil např. Ch. Bjornson a kol. (Bjornson et al., 1999). Geneticky označené embryonální i dospělé NSCs transplantoval do subletálně ozářených myší a po několika týdnech prokázal, že novotvořené buňky kostní dřeně z velké části pocházejí právě z transplantovaných NSCs.

Příklad ilustrující úspěšnost buněčné terapie předložil např. Orlic a spol. (Orlic et al., 2001), kteří experimentálně doložili funkční (hemodynamické) zlepšení stavu myší s navozeným infarktem myokardu po lokální transplantaci purifikovaných kmenových buněk izolovaných z kostní dřeně (plastické kmenové buňky injikované do čerstvého ložiska infarktu myokardu se vydiferencovaly ve funkční kardiomyocyty a cévní elementy – endotelové buňky a myocyty – a umožnily nahradit původně ischemické ložisko funkční tkáně a zajistit jeho vaskularizaci).

Použití kmenových buněk v klinické medicíně představuje velmi nadějnou metodu léčby 21. století. Pro své biologické vlastnosti představují kmenové buňky ideální zdroj buněk pro buněčnou transplantaci a regenerační medicínu. Jejich vpravení do nemocné nebo poškozené tkáně (při absenci či poškození endogenních kmenových buněk) umožní reparaci tkáně a obnovu poškozené funkce. V současné době se transplantace kmenových buněk v klinické praxi omezují zejména na kmenové buňky hematopoetické, ale úspěšné experimenty provedené na zvířecích

modelech naznačují, že buněčnou terapii lze aplikovat téměř na všechny orgány těla a lze očekávat její začlenění do léčebných postupů většiny klinických oborů.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Roztoky, pufrů, fixativa a barviva

- PBS pufr (fyziologický roztok pufrůvaný fosfáty), pH 7,4:

8 g NaCl, 7,164 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> ·12 H<sub>2</sub>O a 0,2 g KCl rozpuštěného v 1000 ml

- Médium pro kultivaci NSCs :

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma)

F12 (Nutrient Mixture F 12 Ham; Sigma)

Penicilin 1000 U/ml (Gibco)

Streptomycin 1000 µg/ml (Gibco)

2mM L-glutamin (Gibco)

N2 suplement (Gibco)

růstové faktory : bFGF 10 ng/ml (Peprotech, USA)

EGF 20 ng/ml (Peprotech, USA)

- Médium pro diferenciaci NSCs :

DMEM / F12 1:1

FCS / fetal calf serum / 10% (Gibco)

2mM L-glutamin (Gibco)

- Trypanová modř:

pracovní roztok: 0,5 ml 0,4% roztoku trypanové modři (Sigma)

0,3 ml pufru HBSS

0,2 ml buněčné suspenze

•4% roztok formaldehydu:

pracovní roztok – 100 ml: 10 ml 40% formaldehydu  
90 ml pramenité vody

•Kamencová želatina:

pracovní roztok: 0,5 g želatiny (Sigma)  
100 ml destilované vody

Nechat nabobtnat cca 1 hod, zahřát a přidat:

0,4 g síranu chromitodraselného  
kafr

•Weigertův železitý hematoxylin

roztok A: 1% hematoxylin v 96% alkoholu (Sigma)  
(10 g hematoxylinu v 1000 ml 96% alkoholu)

roztok B: 4 ml Liquor ferri sesquichlorati  
(4,096 g  $\text{FeCl}_3$  na 10 ml destilované vody)  
1 ml 25% HCl  
(9 ml 36% HCl do 100 ml destilované vody)  
95 ml destilované vody

Před upotřebením se smísí roztok A s roztokem B v poměru 1:1.

•Eosin

pracovní roztok: 1 g eosinu žlutého (Sigma)  
100 ml destilované vody

### **3.2. Laboratorní zvířata**

K našim experimentům byly použity laboratorní myši kmene Balb/c z inbredních chovů. Myši byly chovány v cyklu 14 hod světla a 10 hod tmy a měly volný přístup k potravě i tekutinám.

Experimenty s použitím zvířat byly provedeny v souladu se zásadami pro práci se zvířaty LF UK v Hradci Králové. Zvířata byla usmrcena předávkováním anestetiky.

### **3.3. Chirurgické techniky**

#### **3.3.1. Anestézie**

K anestézii myši byla použita kombinace Narkamonu 5% (ketamin) a Rometaru 2% (xylazin) v poměru 1:1 v množství 1,5 ml/kg. Anestetikum bylo podáno intraperitoneálně.

#### **3.3.2. Odběr embryonální nervové tkáně**

Myši samci byli připuštěni k samicím přes noc a následující den ráno byl označen jako ED0. Od tohoto okamžiku byla zvířata chována odděleně.

Od pregnantních samic myši požadovaného stáří (ED14) se po mediální laparotomii provedené v celkové anestézii odebraly děložní rohy obsahující embrya. Pregnantní samice byla usmrcena předávkováním anestetiky. Embrya v děložních rozích byla přenesena do sterilní nádoby s kultivačním médiem F12. V laminárním boxu v Petriho misce s několika mililitry média byla embrya oddělena od děložních rohů a zbavena plodových obalů. Byla změřena temeno-kostrční délka embryí pro potvrzení jejich stáří.

Pomocí očních nůžek byl mozek embryí izolován a zbaven mozkových obalů. Byly odebrány hemisféry, mezencephalon a prodloužená mícha. Všechny manipulace s embryonálními tkáněmi se prováděly v kultivačním médiu, aby se zabránilo vyschnutí tkáně.

### 3.4. Buněčné kultury

#### 3.4.1. Izolace myších embryonálních buněk mozku

Mozky ED14 myši ponořené do několika mililitrů F12 média byly rozstříhány na malé kousky a poté byla mozková tkáň mechanicky rozmělněna opakovaným šetrným nasáváním mikropipetami o zmenšujícím se průměru až na suspenzi jednotlivých buněk. Suspenze buněk byla přenesena do centrifugační zkumavky, několikrát propláchnuta kultivačním médiem a zcentrifugována 2 min při 1200 g. Množství takto získaných životaschopných mozkových elementů bylo spočítáno pomocí Bürkerovy komůrky. Životaschopnost buněk byla stanovena barvením trypanovou modří. Toto barvivo neproniká přes buněčnou membránu intaktních buněk, ale spolehlivě obarví cytoplazmu buněk, jejichž plazmalema byla při disociaci narušena. Požadovaný počet izolovaných buněk embryonálních myších mozků byl přenesen do kultivačních nádobek s médiem pro kultivaci NSCs; pro kultivaci buněk je vhodná koncentrace přibližně  $2 \times 10^5$  buněk/ml média.



- Obr. 1: Kultivační nádobka Nunclon od firmy Nunc.

V jejím uzávěru je speciální filtr zabraňující mikrobiální kontaminaci. Do této nádobky se přenesou izolované buňky, kultivují se běžně v 8 ml média.

### 3.4.2. Dlouhodobá kultivace NSCs („neurosphere assay“)

Myší fetální buňky mozku byly rutině kultivovány v médiu DMEM/F12 1:1 obohaceném o L-glutamin, N2 suplement, růstové faktory bFGF, EGF a s přidavkem antibiotika (Penicilin, Streptomycin) k ochraně před mikrobiální kontaminací. Kultivace probíhá v inkubátoru při 37°C ve vlhké atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Dno kultivačních misek může být ošetřeno různými komponentami usnadňujícími adhezi buněk. Adherované buňky se mohou šířit po ploše kultivační nádoby; tento typ představuje kultivaci buněk v ploše neboli dvourozměrnou tkáňovou kulturu, přičemž adherované buňky formují jednu vrstvu tzv. monolayer. Další možností je kultivovat buňky volně v médiu bez ošetření dna kultivační nádoby adhezivními faktory. Dělením buněk vznikají trojrozměrné kulovité útvary označující se neurosféry.

Buňky byly udržovány v nezralosti pasážováním podle potřeby většinou každý 3. den.

#### 1. Pasážování monolayeru

Z kultivační nádoby s buňkami bylo odsáto médium a byly přidány 2 ml 0,1% trypsinu (Sigma) rozpuštěného ve 2 ml pufru PBS. Nádoba byla umístěna do inkubátoru na 10 min při 37°C. V průběhu inkubace došlo k uvolnění buněk ode dna kultivační nádoby. Následně byl trypsin inaktivován přidáním 0,5 ml séra FCS. Suspenze odvolněných buněk byla odsáta pipetou a zcentrifugována při 1200 g po dobu 2 min. Po odsátí supernatantu bylo množství buněk spočítáno po obarvení trypanovou modří v Bürkrově komůrce a rozděleno do kultivačních nádobek (2 miliony buněk/1 nádobka) s čerstvě připraveným médiem.

#### 2. Pasážování neurosfér

##### ◆ A: mechanická disociace

Buňky (neurosféry) byly uvolněny speciální škrabkou ode dna kultivační nádoby a přeneseny i s médiem do centrifugační zkumavky. Po centrifugaci při 1200 g po dobu 2 min byl odsát supernatant. Opakovaným šetrným nasáváním mikropipetou (o objemu 80-100 µl) byly neurosféry rozvolněny na jednobuněčnou suspenzi. Množství životaschopných elementů bylo spočítáno po obarvení trypanovou modří v Bürkerově komůrce. Podle počtu živých buněk byla suspenze rozdělena v poměru 1:2 nebo 1:3 do dvou, případně třech kultivačních nádobek s čerstvě připraveným médiem.

- ◆ B: pomocí trypsinu / trypsinizace /

Ke zcentrifugovaným buňkám byly přidány 2 ml 0,1% trypsinu (Sigma) rozpuštěného ve 2 ml pufru PBS. Natrávení dále probíhalo ve vodní lázni při 37°C 10 min za stálého třepání. Poté byl trypsin inaktivován přidáním 0,5 ml séra FCS. Suspenze byla zbavena trypsinu opakovaným promýváním pufrům a následným zcentrifugováním. Množství buněk v suspenzi bylo spočítáno a rozděleno do kultivačních nádobek stejným způsobem jako při mechanické disociaci neurosfér.

### 3.4.3. Diferenciace NSCs („differentiation assay“)

#### 1. Potažení dna kultivačních misek polyornitinem (PORN)/lamininem

- speciální látky usnadňující adhezi buněk

- ◆ A: Příprava PORN:

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním polyornitinu hydrobromidu (Sigma) ve sterilní vodě nebo 0,1M kyselině borité-NaOH pufru (pH 8,4) na roztok o koncentraci 1-10 mg/ml. Poté byl roztok přefiltrován přes 0,22 µm filtr (Milipore, Bradford, MA). Aliquoty byly skladovány při –20°C. Před použitím byl připraven pracovní roztok rozředěním zásobního roztoku na koncentraci 10 µg/ml.

Dna kultivačních misek byly v dostatečném množství přelity pracovním roztokem PORN. Misky byly vloženy na 30 min do inkubátoru při 37°C, následoval 3x oplach sterilní vodou, dále byly misky přelity sterilní vodou a skladovány při –20°C v zataveném plastickém sáčku. V případě, že budeme potahovat i lamininem 2x opláchneme PBS.

- ◆ B: Příprava lamininu:

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním lamininu (myší nebo potkaní, Gibco) ve sterilním PBS na roztok o koncentraci 5 mg/ml. Aliquoty byly skladovány při –80°C. Pracovní roztok byl připraven rozředěním zásobního roztoku ve sterilním PBS na koncentraci 5 µg/ml.

Dna kultivačních misek potažené PORN byla přelita pracovním roztokem lamininu. Následovala inkubace 24 hod při 37°C, 3x oplach v PBS, přelití PBS. Misky se nesmí nechat vyschnout a dále je skladujeme při –20°C v zataveném plastickém sáčku. Před vlastním použitím pro kultivaci buněk se po rozmrazení PBS odsaje a misky se naplní čerstvě připraveným médiem.



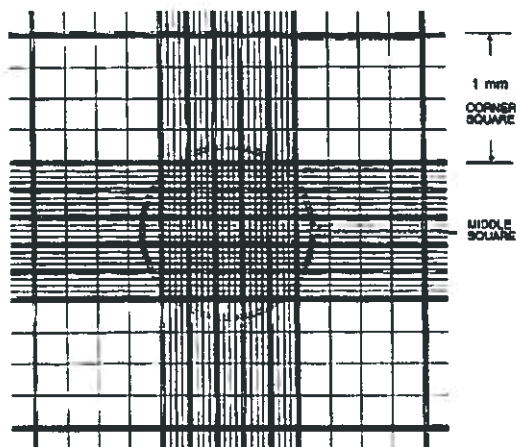
## 2. Vlastní diferenceiace NSCs

Misky předem ošetřené adhezivními faktory (PORN, laminin) byly naplněny médiem pro diferenceiaci NSCs a buňkami a vloženy do inkubátoru při 37°C a atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>.

Buňky nebyly pasážovány. Podle stavu kultury bylo přibližně každý 3. den kompletně vyměněno médium nebo jen přidán růstový faktor bFGF a N2 suplement.

### 3.4.4. Barvení a počítání

Vyhodnocení viability buněk bylo prováděno v Bürkerově komůrce, která má na dně vyrytou mřížku, rozdělující komůrku na malé a velké čtverce. Fixní vzdálenost krycího skla ode dna komůrky zaručuje standardní objemy prostorů nad velkými a malými čtverci (4 nl a 0,25 nl). Bylo vybráno několik čtverců (vždy jen malých nebo jen velkých), ve kterých byl spočítán počet živých buněk a z tohoto vypočítán aritmetický průměr. Dále podle objemů nad čtverci, ve kterých jsme počítali, byl vypočítán počet živých buněk v 1 $\mu$ l suspenze. Poté bylo spočítáno množství suspenze s buňkami, které je třeba vysadit do kultivační nádoby.



• Obr. 2: Mřížka Bürkerovy komůrky

### **3.5. Mikroskopie a fotodokumentace**

Buněčné kultury byly vyšetřovány ve světelném mikroskopu Nikon Eclipse TE 300 s fázovým kontrastem.

Fotografická dokumentace byla pořízena pomocí fotoaparátu Nikon F-601 nebo digitálního fotoaparátu Olympus Camedia C-4040 ZOOM.

Histologické řezy byly pozorovány ve světelném mikroskopu Olympus BX 51 s digitální kamerou Olympus DP 70. Obraz byl snímán a uchován v elektronické podobě.

### **3.6. Zpracování neurosfér pro histologické vyšetření**

Neurosféry byly zpracovány klasickou histologickou technikou za účelem zhotovení preparátů na podložním skle pro mikroskopickou diagnostiku.

#### **3.6.1. Fixace**

Neurosféry promyté pufrům byly co nejrychleji (z důvodu autolýzy) zfixovány 4% formaldehydem po dobu 10 minut, promyty destilovanou vodou a přefiltrovány přes filtrační papír.

#### **3.6.2. Odvodnění a prosycení parafínem**

Do kapslí uložené neurosféry byly odvodněny a prosyceny parafínem pomocí tkáňového odvodňovacího automatu (Leica TP 1020). Dehydratace probíhá v deseti nádobách naplněných vzestupnou řadou alkoholů (70%, 90%, 96% a 100% alkohol) acetonem a xylenem. Prosyceny byly v dalších dvou lázních naplněných měkkým a tvrdým parafínem (rozdílný poměr včelího vosku a parafínu).

#### **3.6.3. Zalití do parafínového bločku**

Prosycené neurosféry byly zality do tekutého parafínu v zalévací komůrce tak, aby vznikl po zchlazení parafínový bloček.

#### 3.6.4. Krájení tenkých histologických řezů

Krájením na sáňkovém mikrotomu s automatickým posunem (Leica SM 2000 R) byly zhotoveny z parafinového bločku obsahujícího neurosféry histologické řezy, silné 5-6  $\mu\text{m}$ . Řezy byly lepeny na podložní sklo roztokem kamencové želatiny.

#### 3.6.5. Barvení pomocí hematoxylinu-eosinu

Před vlastním obarvením musí být řezy odparafinovány xylenem + sestupnou řadou alkoholů (100%, 96%, 90%, 70% alkohol).

Následně po oplachu v destilované vodě byly řezy barveny roztokem Weigertova železitého hematoxylinu 4 min, diferencovány (odbarvovány) několik vteřin v kyselém alkoholu (3-5 kapek HCl na 100 ml 70% alkoholu) a poté propírány 10 min pod tekoucí pramenitou vodou. Následovalo dobarvení roztokem eosinu 2 min, oplach v destilované vodě a odvodnění vzestupnou řadou alkoholů a xylenem.

Hematoxylin barví jádra buněk (jaderný chromatin) modře, ale zároveň přibarví drsné endoplazmatické retikulum, některá sekreční granula (zymogenní), atd. Eosin barví růžově cytoplazmu a růžovo-červeně eosinofilní granula aj.

#### 3.6.6. Zamontování preparátů do montovacího média

Na zamontování řezu mezi podložní a krycí skličko bylo použito DPX (syntetická pryskyřice). Jeho výhodou je, že tvrdne výrazně rychleji než kanadský balzám nebo jiná montovací média.

#### 4. Použité laboratorní přístroje a zařízení

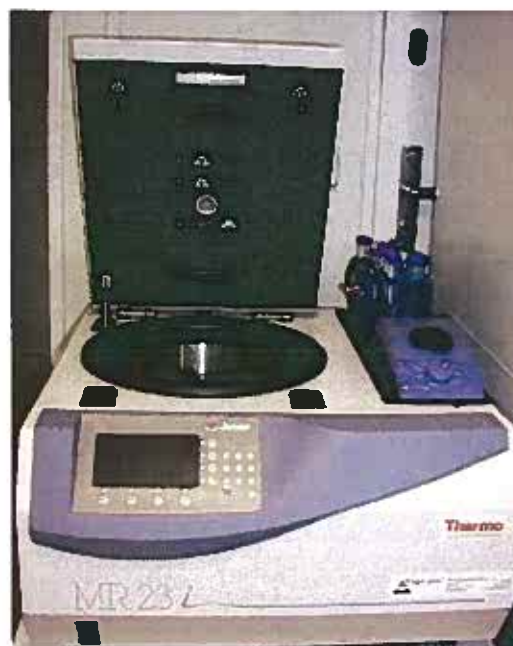


- Obr. 3: Laminární box Jouan MSC 12  
- slouží pro udržení sterilního prostředí při manipulaci s buněčnými kulturami



Obr. 4

- Obr. 4: Laboratorní inkubátor Heraeus Hera Cell 150/240  
- s nastavitelnou teplotou a atmosférou CO<sub>2</sub>  
- slouží k udržení stálého prostředí nutného pro kultivaci buněk



Obr. 5

- Obr. 5: Centrifuga Jouan MR 2  
- laboratorní chlazená odstředivka



- Obr. 6: Světelný mikroskop Nikon Eclipse TE 300 s fázovým kontrastem - je opatřen plastovým boxem pro sterilní manipulaci s buněčnou kulturou, v horní části nad mikroskopem se nachází zařízení pro regulaci teploty v plastovém boxu.



- Obr. 7: Světelný mikroskop Olympus BX 51 s digitální kamerou Olympus DP 70 - se objektivy 4 x, 10 x, 20 x, 40 x, 60 x, 100 x



Obr. 8



Obr. 9

- Obr. 8: Tkáňový odvodňovací automat Leica TP 1020  
- slouží k dehydrataci a čištění histologických vzorků tkání rozpouštědly a ke konečnému sycení vzorků tekutým parafinem
- Obr. 9: Sáčkový mikrotom Leica SM 2000 R  
- používá se ke krájení parafinových bločků

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Kultivace neurálních kmenových buněk

Kultivace buněk představuje pěstování živých buněk *in vitro* a současně umožňuje jejich mikroskopické vyšetření. Výhodou této techniky je především možnost sledovat chování a morfologické změny během vývoje živých buněk (proliferační, diferenciace, apoptóza). Pro schopnost buněk dělit se i v průběhu kultivace lze *in vitro* původní populaci buněk namnožit a tak získat jejich dostatečné množství pro další experimenty a terapeutická využití (transplantace NSCs atd.). Nevýhodou buněčných kultur je, že nelze navodit podmínky, v nichž buňky vyrůstají *in vitro* tak, aby zcela odpovídaly podmínkám *in vivo*.

Nervová tkáň izolovaná ze 14ti denních myších embryí se nejprve disociuje na jednotlivé buňky. Suspenze těchto buněk se v optimální koncentraci vyseje do kultivačních misek. Izolované části CNS se rozstříhají na drobnější kousky, a poté se mechanicky rozmělní opakovaným nasáváním pipetou na jednotlivé buňky. Promytím suspenze buněk puřem se odstraní fragmenty poškozených buněk a větší shluky tkáně, které nelze rozmělnit.

Před výsevem buněk do kultivačních misek je nezbytné určit procento živých a mrtvých buněk v suspenzi. Po obarvení suspenze buněk trypanovou modří (ta neproniká přes buněčnou membránu živých buněk a barví tedy pouze mrtvé buňky), spočítáme množství životaschopných buněk v Bürkerově komůrce. Měření je třeba provést v několika čtvercích a vypočítat aritmetický průměr.

K zajištění požadovaných podmínek pro růst buněk *in vitro* je třeba vysít buňky do kultivační nádoby v optimální hustotě. Pro kultivaci NSCs je vhodná koncentrace přibližně 2-3x 10<sup>5</sup> buněk/ml média.

Buňky se kultivují v kultivačních nádobkách se směsí média DMEM a F12 s přídavkem L-glutaminu, N2 suplementu a antibiotik (penicilin/streptomycin). Dále se přidávají růstové faktory EGF a bFGF. Kultivační misky s buňkami se přenesou do inkubátoru, který udržuje standardní nezbytné podmínky pro kultivaci (teplota 37°C, složení atmosféry 5% CO<sub>2</sub>, vlhkost, tma).

NSCs lze kultivovat dvěma různými způsoby:

1. Ve formě monolayeru – kultivace NSCs v ploše. Dno kultivačních misek je potaženo adhezivními komponentami. V důsledku toho buňky přilnou ke dnu a šíří se po ploše. Již první dny

po výsevu buněk lze pozorovat rostoucí výběžky adheovaných buněk. Kultury se udržují v nezralosti pasážováním pomocí trypsinu přibližně každý 3. den.

Jestliže přidáme ke kultivačnímu médiu sérum (FCS), podpoříme diferenciaci buněk. V kultuře se vytvářejí shluky neurálních buněk, kde se vyskytují jak nervové, tak gliové buňky (astrocyty a oligodendrocyty).

Kromě živých diferencujících se buněk lze v kultuře pozorovat i určitý počet odumírajících buněk. Tyto buňky se zakulacují, stahují své výběžky, uvolňují se ode dna kultivační misky a plavou v médiu. Při výměně média jsou zbytky odumřelých buněk odsáty se starým kultivačním médiem.

2. Ve formě trojrozměrných útvarů – neurosfér. Buněčná suspenze se vysévá do kultivačních nádobek s neadhezivním povrchem. NSCs prolifерují a vytvářejí mnohobuněčné útvary sférického tvaru. Neurosféry mohou vzájemně adherovat a vytvářet útvary, jejichž velikost může až několikanásobně převýšit velikost původních neurosfér.

Uvnitř neurosfér dochází postupně k rozlišnému vývoji buněk. Je to způsobeno rozdílnými podmínkami, v nichž tyto buňky rostou. Buňky uvnitř neurosféry vyžívají, zatímco buňky na jejím povrchu zůstávají nezralé. NSCs uvnitř sferoidů se postupně diferencují v buňky neuronální, astrocytální a oligodendrocytální linie.

Včasnou a pravidelnou disociací (pasážováním) neurosfér lze zabránit vyžívání buněk uvnitř neurosféry.

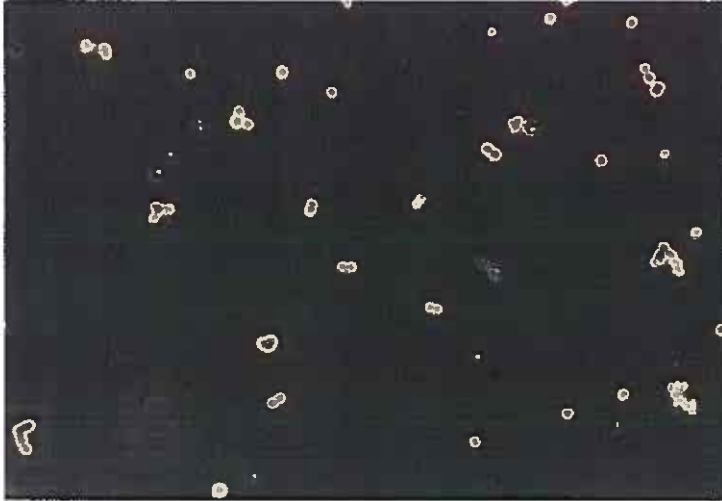
Uvnitř neurosféry poměrně často dochází i k buněčné smrti (apoptóze), a to jako projev nedostatečného zásobení kyslíkem a živinami.

K průkazu spontánního diferenciačního potenciálu (multipotence) NSCs *in vitro* se používá tzv. diferenciační esej („*differentiation assay*“). Neurosféra se přenesse do kultivačních nádobek potažených adhezivními látkami s kultivačním médiem bez růstových faktorů s přidavkem séra. V těchto podmínkách mohou buňky neurosféry přilnout k povrchu kultivační nádoby. Z adheovaných neurosfér vycestovávají nezralé buňky, vytvářejí monolayer a vyžívají v buňky neuronální, astrocytální i oligodendrocytální linie.

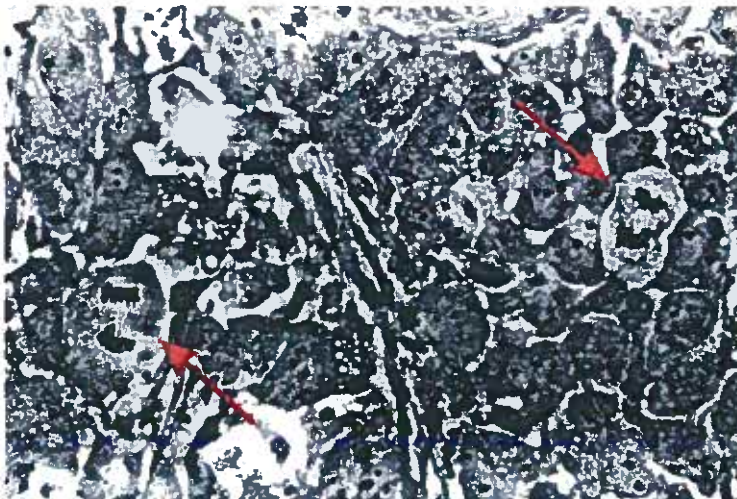


## 5.2. Obrazová část

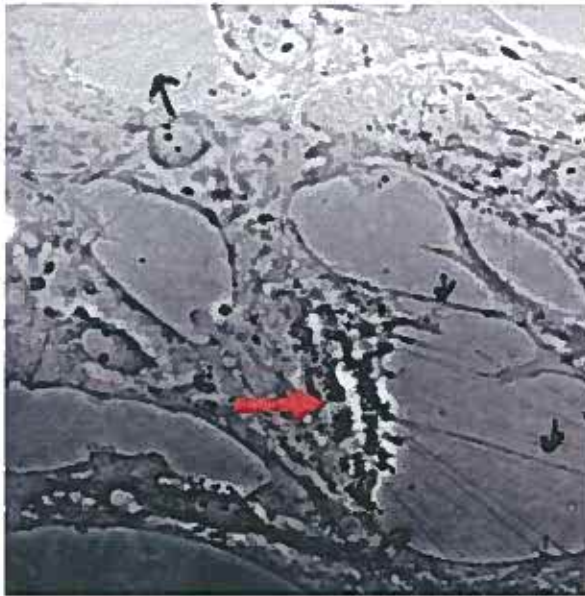
### 5.2.1. Kultivace ve formě monolayeru



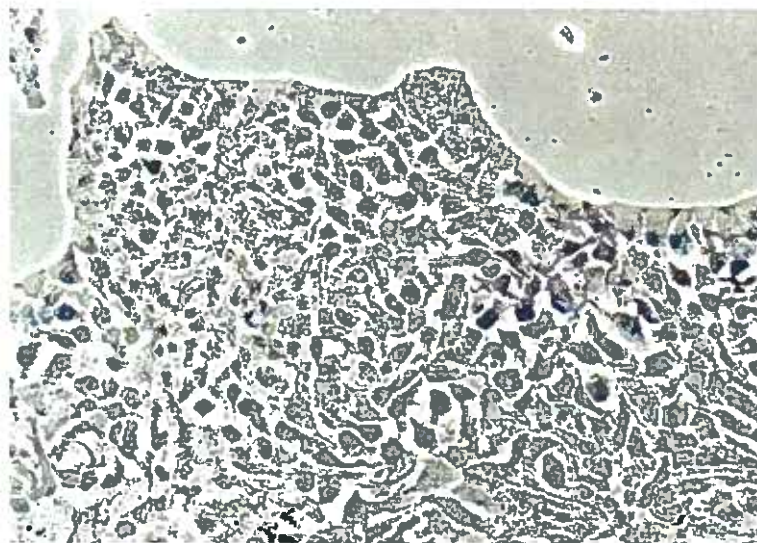
- Obr. 10: Suspenze NSCs po izolaci z nervové tkáně. Živé buňky mají světlou barvu, mrtvé buňky jsou tmavé.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 20x



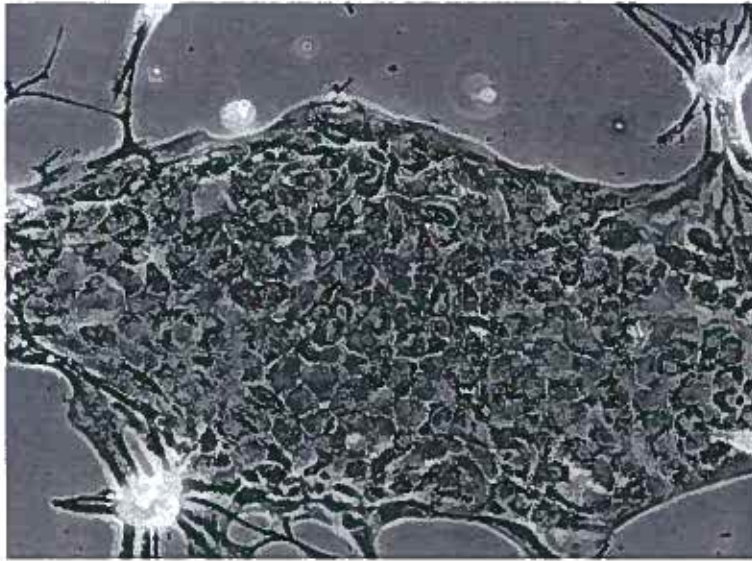
- Obr. 11: Kultura NSCs pěstovaná ve formě monolayeru na lamininu, 15 dní po založení kultury. V některých buňkách se podařilo zachytit mitózy (červené šipky).
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 60x



- Obr. 12: Buněčná smrt v kultuře NSCs pěstované ve formě monolayeru, 14 dní po založení kultury, 2. pasáž. Zbytek buněčného těla (červená šipka) a vlákna – kotvící fibrily (černé šipky), která vedou do místa původního uchycení buňky.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 40x

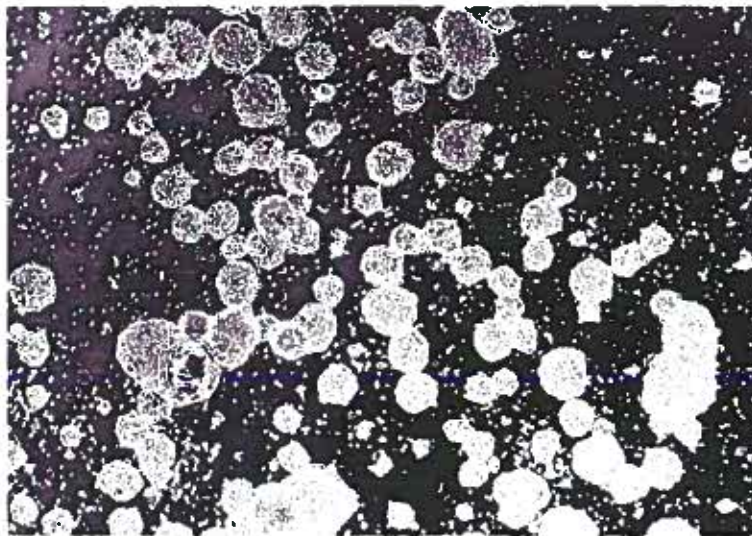


- Obr. 13: NSCs ve formě monolayeru – epiteloidní uspořádání, 58 dní po založení kultury, 7. pasáž.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 20x

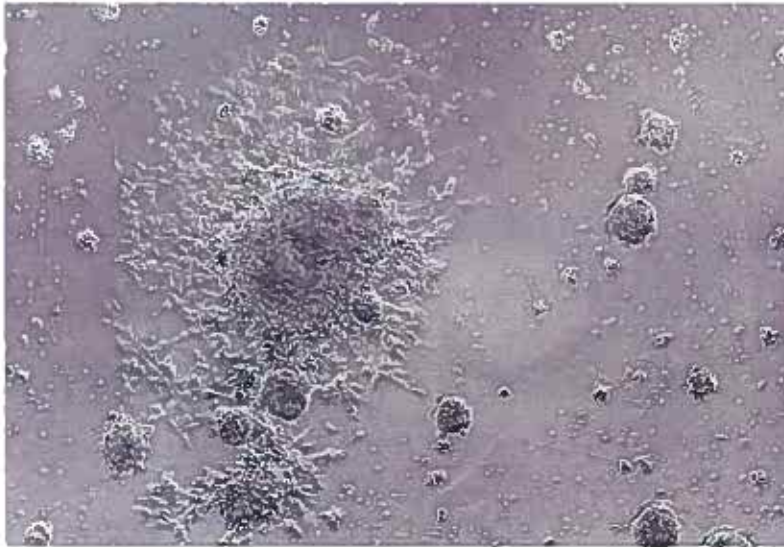


- Obr. 14: NSCs ve formě monolayeru  
- fázový kontrast  
- s použitím objektivu 20x

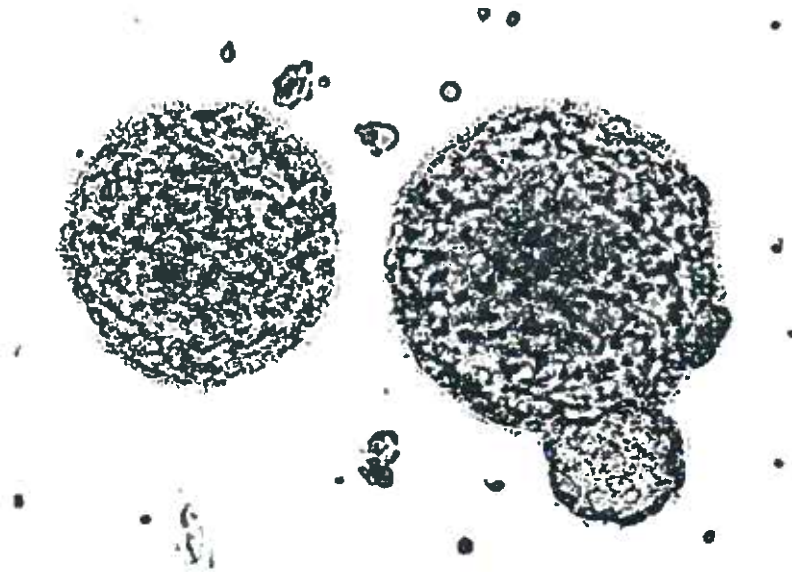
#### 5.2.2. Kultivace ve formě neurosfér



- Obr. 15: NSCs kultivované ve formě neurosfér, 5 dní po založení kultury. Některé sferoidy k sobě přisedají a tvoří větší útvary.  
- fázový kontrast  
- s použitím objektivu 20x

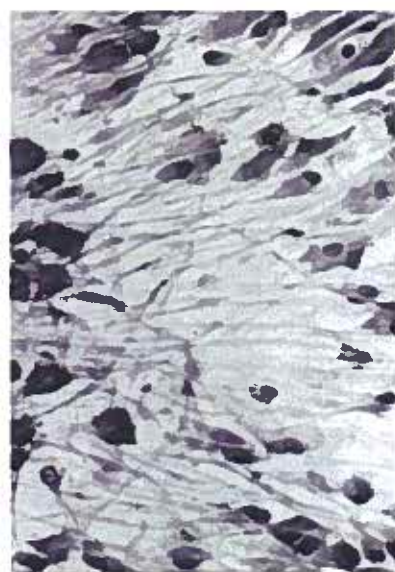


- Obr. 16: Ve středu obrázku je primární neurosféra, v jejím okolí se tvoří z vycestovaných NSCs sekundární neurosféry.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 20x



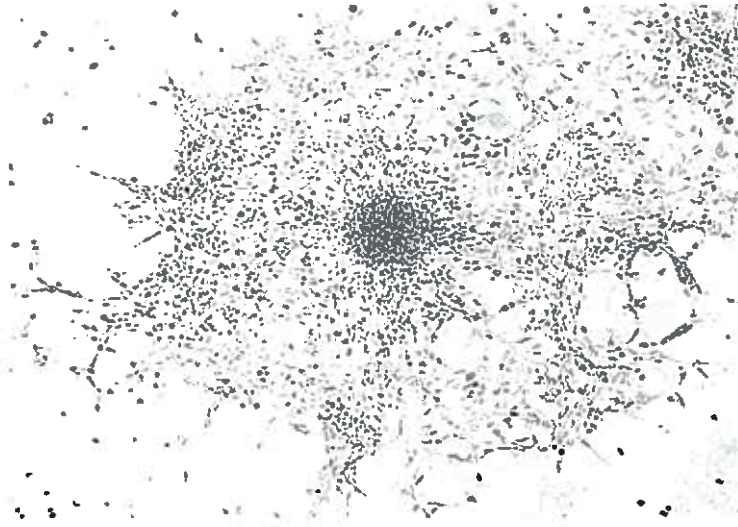
- Obr. 17: Neurosféry jemně adherující ke dnu kultivační nádoby.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 40x

### 5.2.3. Neurosféry vytvářející monolayer

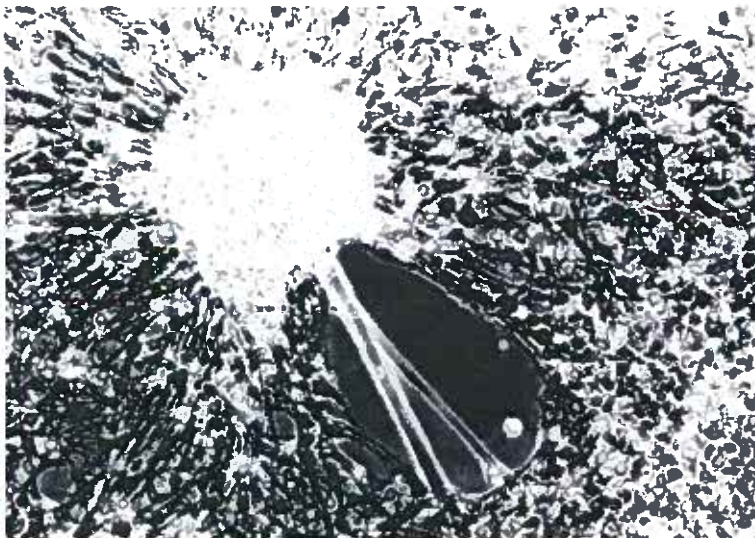


- Obr. 18: Migrace a diferenciace buněk z neurosféry po její adhezi ke dnu kultivační nádoby. Buňky v těsné blízkosti neurosféry – štíhlé s dlouhými cytoplazmatickými výběžky - připomínají radiální glii, buňky umístěné na periferii kolonie – oploštělé buňky s četnými krátkými výběžky - se podobají astrocytům.  
(barveno: hematoxylin – eosin)

- s použitím objektivu – horní obr. 40x
- s použitím objektivu - dolní obr. 60x



- Obr. 19: Z těsně adheřované neurosféry se buňky hojně šíří do okolí a mohou vytvářet monolayer.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 20x

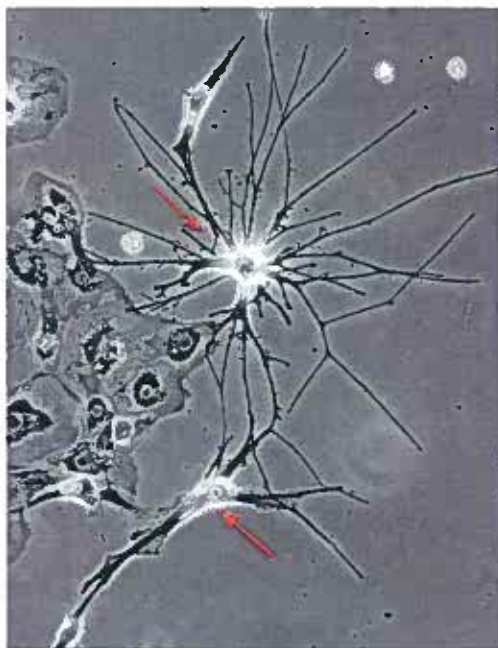


- Obr. 20: Adheřovaná neurosféra šířící se do okolí a vytvářející monolayer. Na její spodní části se vytvořila dutinka – prostor neosídlený buňkami přepažený dvěma výběžky podobnými axonům, které vysílají vyžrávající neurony, jejichž těla jsou v neurosféře.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 20x

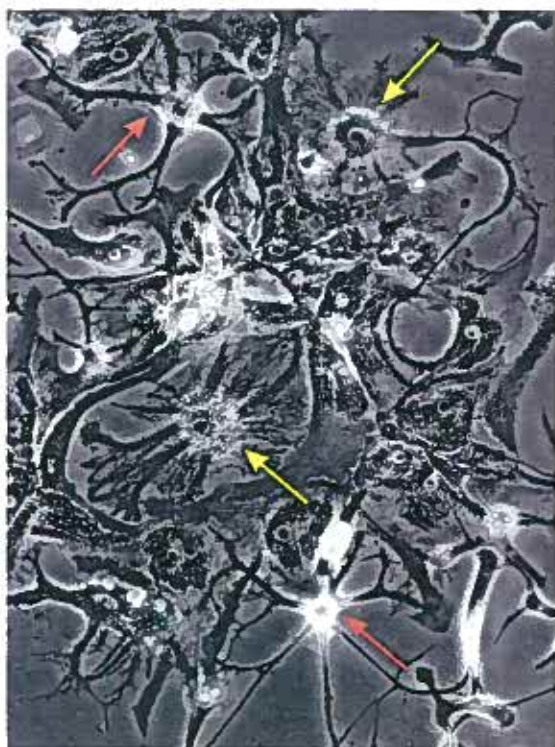
#### 5.2.4. Diferencované buňky



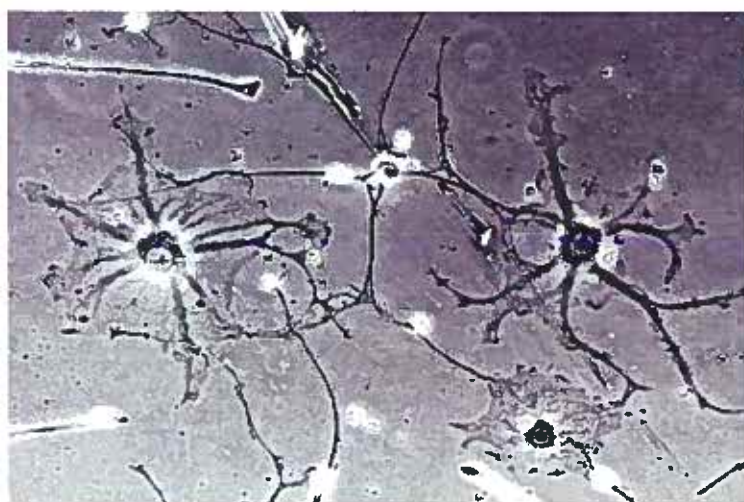
- Obr. 21: Diferencovaná buňka, zřejmě astrocyt – patrná organizace cytoskeletu.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 40x



- Obr. 22: Ve středu obrázku dvě buňky s výběžky připomínající multipolární neurony (červené šipky), na levém okraji jsou buňky ještě nediferencované mající uspořádání neuroepitelu.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 40x

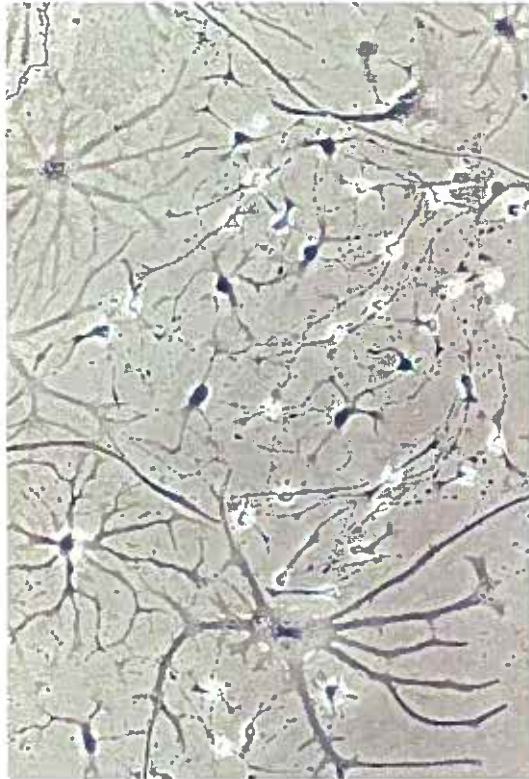


- Obr. 23: Buňky připomínající astrocyty, kulovité buňky s kratšími a hustěji uspořádanými výběžky – plazmatické astrocyty (žluté šipky), buňky s dlouhými tenkými výběžky – fibrilární astrocyty (červené šipky).
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 40x

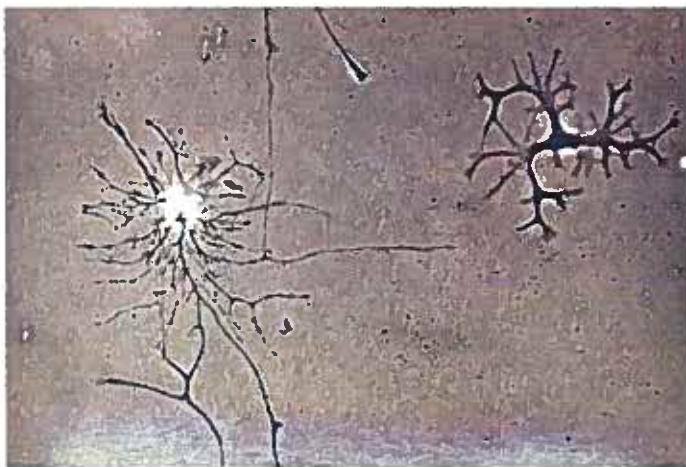


- Obr. 24: Buňky připomínající astrocyty, patrná organizace cytoskeletu.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 40x



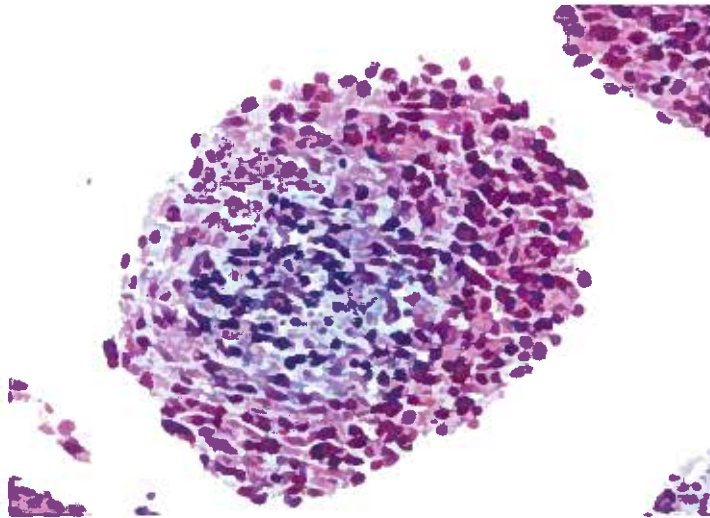


- Obr. 25: Na levém okraji obrázku se nacházejí buňky připomínající fibrilární astrocyty, ve středu a napravo jsou menší buňky připomínající oligodendrocyty.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 40x

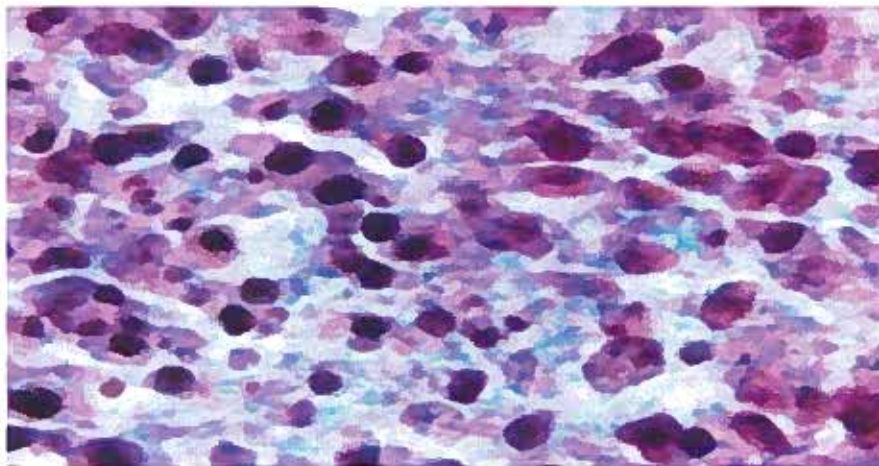


- Obr. 26: Vlevo je buňka podobající se multipolárnímu neuronu, vpravo zřejmě astrocyt.
  - fázový kontrast
  - s použitím objektivu 40x

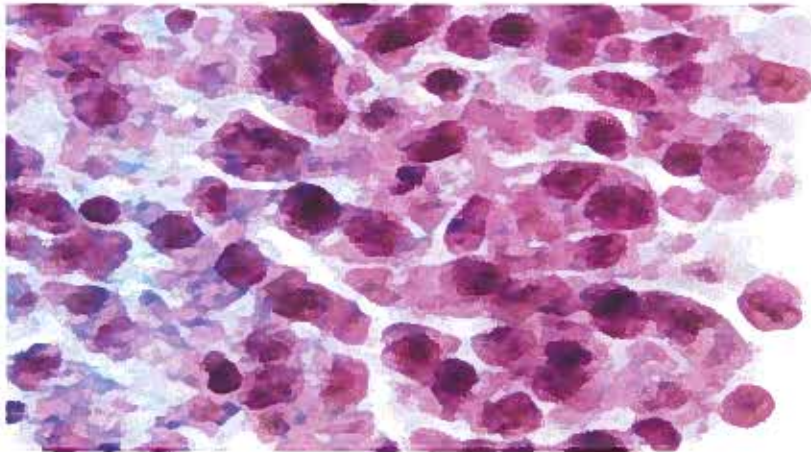
### 5.2.5 Neurosféry po histologickém zpracování



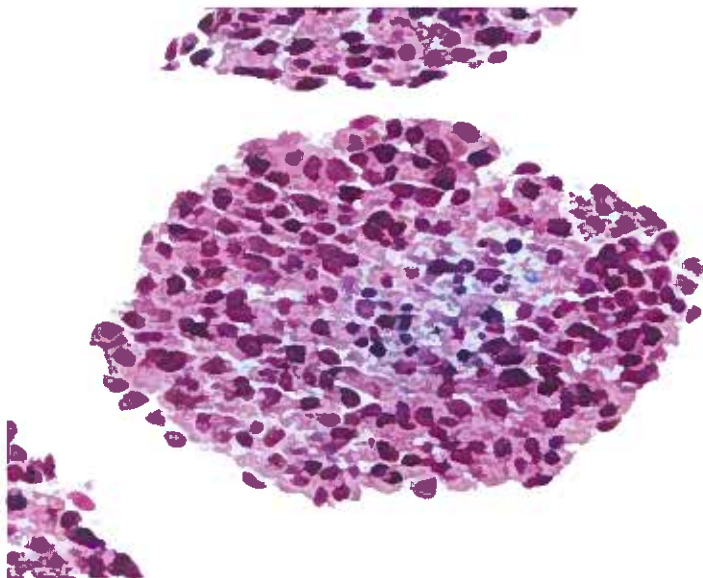
- Obr. 27: Řez neurosférou, 11 dní po založení kultury, 2. mechanická pasáž.  
(fixace 4 % formaldehydem, zalito do parafinu, barveno: hematoxylin – eosin)  
- s použitím objektivu 32x



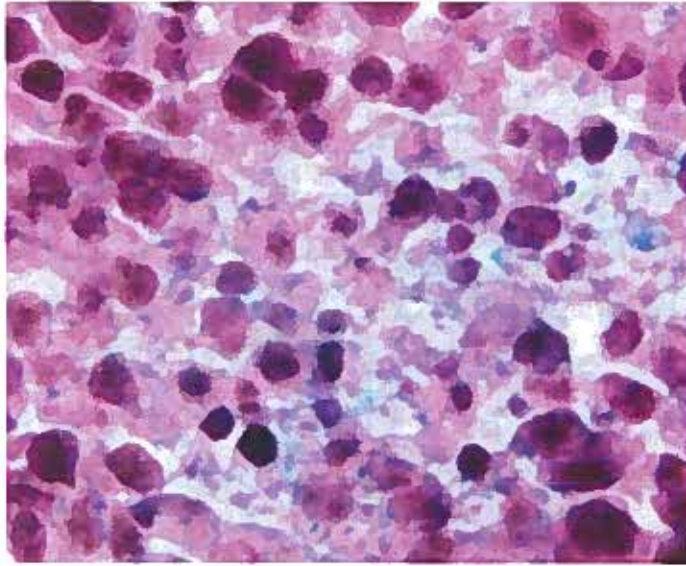
- Obr. 28: Detail centra neurosféry (zachycené na obr. 16). Buňky v centru neurosféry se nachází ve vyšším stupni diferenciace, vyznačují se kondenzovanějším chromatinem. Některé buňky podléhají apoptóze.  
- s použitím objektivu 120x



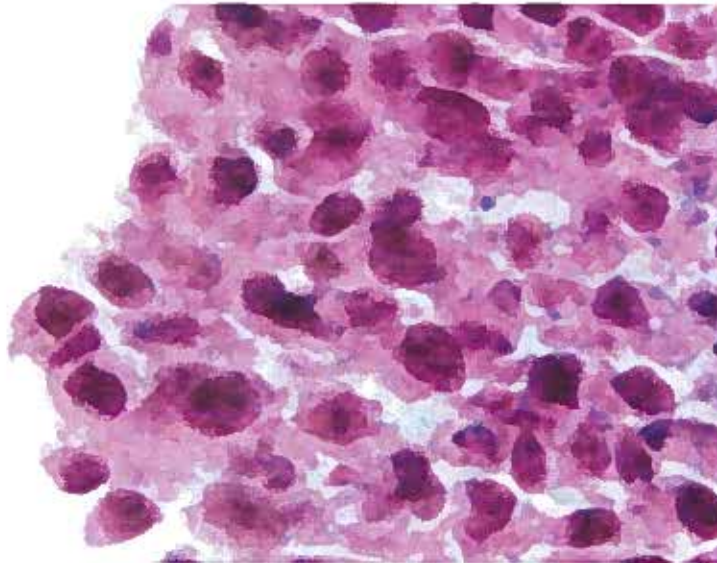
- Obr. 29: Detail okrajové části neurosféry (zachycené na obr.16) s buňkami méně zralými.
  - s použitím objektivu 120x



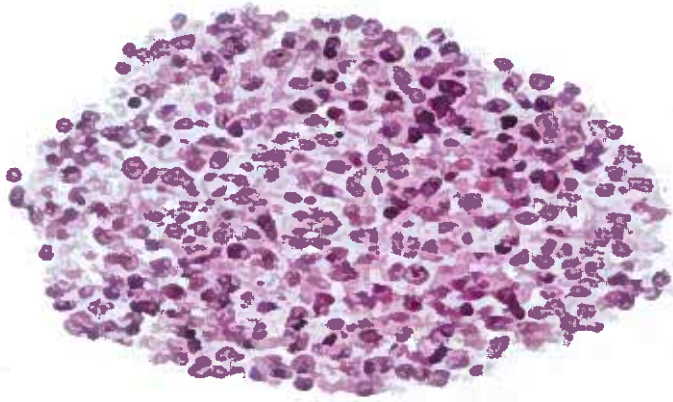
- Obr. 30: Neurosféra, 11 dní po založení kultury, 2. mechanická pasáž.  
(fixace 4 % formaldehydem, zalito do parafinu, barveno: hematoxylin – eosin)
  - s použitím objektivu 40 x



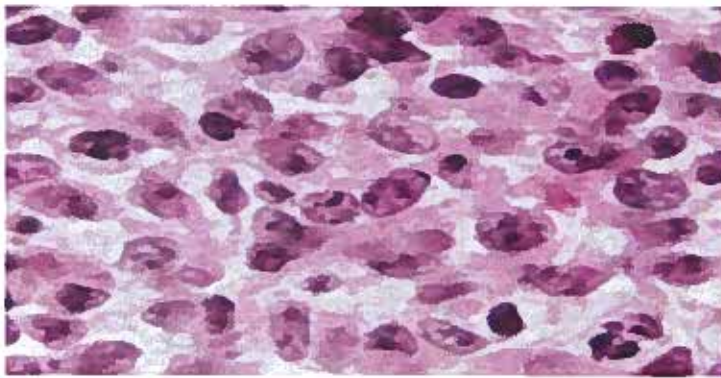
- Obr. 31: Detail centra neurosféry (zachycené na obr. 19), jsou zde vidět kondenzace chromatinu i cytoplazmy v buňkách a zřejmě i apoptotické buňky.  
- s použitím objektivu 120x



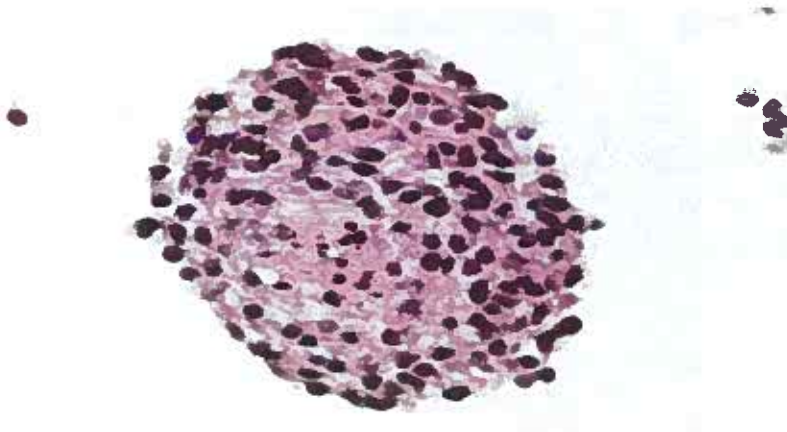
- Obr. 32: Detail okrajové části neurosféry (zachycené na obr. 19), v jádrech buněk jsou patrná jadérka.  
- s použitím objektivu 120x



- Obr. 33: Neurosféra s homogenní strukturou, buňky se zde nacházejí v podobném stádiu diferenciace. 13 dní po založení kultury, 3. pasáž.  
(fixace 4 % formaldehydem, zalito do parafinu, barveno: hematoxylin – eosin)  
- s použitím objektivu 40x



- Obr. 34: Detail centra neurosféry (zachycené na obr. 22)  
- s použitím objektivu 120x



- Obr. 35: Neurosféra, 5 dní po trypsinizaci, 12. pasáž.  
(fixace 4 % formaldehydem, zalito do parafinu, barveno: hematoxylin – eosin)  
- s použitím objektivu 50x

## 6. DISKUZE

### Kultivace neurálních kmenových buněk

Výzkum kmenových buněk čile postupuje dopředu; stále se rozvíjejí znalosti o tom, jak se organismus vyvíjí z jediné buňky, a jak zdravé buňky nahrazují ty poškozené v dospělém organismu. Studium kmenových buněk dnes patří k jednomu z nejvíce fascinujících oborů biomedicíny.

Původní metoda pro izolaci a kultivaci NSCs z embryonálních mozků byla zavedena Reynoldsem a Weissem (Reynolds et Weiss, 1992) a posléze byla na Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové převzata a modifikována Mokřým (Mokřý, 1999).

Principem této metody je disociace nervové tkáně na jednotlivé buňky. Tato suspenze se v požadované koncentraci buněk vyseje do kultivačních misek. Věk nervové tkáně určuje množství NSCs v tkáni, množství exprimovaného receptoru pro daný růstový faktor (EGF, bFGF aj.) a též podmiňuje možnost odebrat tkáň již vydifferentiovanou (Mokřý, 1999). Nejvhodnější věk pro odběr NSCs z myších embryonálních mozků je mezi ED12 – ED16.

Disociace embryonální nervové tkáně může být provedena dvěma způsoby. Jedním způsobem je použití trypsinizace. Ta však vede ke značnému poškození buněk a látky uvolněné z poškozených buněk do média neprospívají proliferaci a přežívání NSCs *in vitro*. Šetrnějším způsobem je pouhá mechanická disociace nervové tkáně opětovným nasáváním pipetou.

Hustota vysetých buněk do značné míry ovlivňuje, jak vysoké procento NSCs v kultuře přežije a začne proliferovat. Přežívání NSCs *in vitro* usnadňuje větší denzita (400 tis. buněk/ml), kdy proliferuje 1,5 % buněk v médiu a tvoří sferoidy (Svendsen et al., 1995).

Další nutné podmínky pro kultivaci NSCs zajišťuje složení kultivačního média. Při dlouhodobé kultivaci se osvědčilo základní médium (DMEM/F12) obohacené o L-glutamin, N2 suplement (obsahující inzulin, transferin, progesteron, selenium a putrescin) a antibiotika (penicilin/streptomycin); jako mitogen se do média přidávají růstové faktory EGF, bFGF. V případě média pro diferenciaci se jako nejvhodnější potvrdilo použití základního média s příměsí fetálního telecího séra, L-glutaminu a antibiotik, bez přidání EGF a bFGF. Po vysetí buněk se kultivační nádobky přenesou do inkubátoru, který udržuje standardní podmínky.

Buňky mohou být kultivovány v ploše, kdy se buňky nechají přilnout ke dnu kultivační nádoby, které je ošetřeno látkami usnadňujícími adhezi buněk. Adherované buňky se šíří po dně nádoby a tvoří jednu vrstvu – monolayer. Jedná se dvourozměrnou tkáňovou kulturu, kde buňky jsou v kontaktu navzájem a navíc se dnem nádoby a to je zpětně ovlivňuje.

Poté, co se nadměrně zvýší denzita buněk v této vrstvě (čile se dělicí populace buněk), mezibuněčné interakce spolu se sníženou dostupností potřebných látek vedou ke zpomalení růstu buněk. Tam, kde je žádoucí sledovat buňky ve formě monolayeru, je třeba před dosažením konfluence kulturu disociovat a přesadit do nových misek (Mokrý, 1999).

Jestliže přidáme k médiu sérum (FCS) nezralé nervové buňky se diferencují rychleji. V kultuře se vytvářejí shluky neurálních buněk, kde se vyskytují jak nervové, tak gliové buňky.

Adherované buňky mohou po vhodném substrátu nebo podél výběžků sousedních buněk migrovat. Tato schopnost dokládá vitalitu buněk pěstovaných *in vitro* a napomáhá formování buněčných shluků. Nervové buňky vysílají své výběžky i mimo shluky. Pokud neurity dosáhnou až sousedního shluku, vytvoří synaptické zakončení s neurony tohoto seskupení, a tím se pevně uchytí.

Neurit sám neadheruje ke dnu kultivační nádoby. Je pevně fixován jen v místě perikarya nervové buňky (která ho vysílá) a v místě synaptického zakončení. Tento jev lze pozorovat *in vitro* při pohybu kultivační misky, kdy se dlouhé pružné neurity chvějí v pohybujícím se médiu (Mokrý, 1999).

V kultuře lze pozorovat kromě živých diferencujících se buněk i určité procento odumírajících buněk. Tyto buňky se zakulacují, stahují své výběžky, uvolňují se ode dna kultivační misky a plavou v médiu. Při výměně média jsou zbytky odumřelých buněk odsáty se starým kultivačním médiem. Výměna média se provádí přibližně jednou za tři dny. Výhodou kultivace v ploše je přímé sledování buněk v kultuře.

Jiný způsob kultivace NSCs představuje formaci buněk do trojrozměrných (3D) útvarů neurosfér. Buněčná suspenze získaná z nervové tkáně se vyseje do kultivačních misek s neošetřeným povrchem. Diferencované buňky obsažené v suspenzi se nemohou přichytit ke dnu misky a vyžrát, proto podléhají buněčné smrti, zatímco nediferencované NSCs účinkem mitogenů (EGF a bFGF) přežívají a prolifерují. Nemohou přilnout ke dnu misky, vzájemně adherují a jejich opakovanými děleními vznikají mnohobuněčné útvary sférického tvaru. V ideálních podmínkách vznikají všechny buňky neurosféry z jediné NSC a neurosféra je pak klonem buněk stejného původu (Filip et al., 2006).

Velikost sferoidů se nejrychleji zvětšuje v průběhu prvních dvou týdnů, později se ustálí na průměru 300-400  $\mu\text{m}$  (Mokrý, 1999). S narůstající velikostí neurosfér dochází k rozdílnému vývoji

buňek uvnitř neurosfér. Je to způsobeno rozdílnými podmínkami, v nichž tyto buňky rostou. Povrchové buňky si ponechávají nezralý charakter, zatímco buňky uvnitř vyžívají. NSCs uvnitř sferoidů se postupně diferencují v buňky neuronální, astrocytální a oligodendrocytální linie.

Spontánní diferenciaci buněk uvnitř neurosfér lze zabránit včasnou disociací neurosfér, přičemž se buněčná suspenze neurosférálních buněk opět vyseje do misek za stejných podmínek. To umožní formování nových neurosfér.

Poměrně častým fenoménem vyskytujícím se ve všech vývojových etapách neurosfér je buněčná smrt (apoptóza) uvnitř neurosféry. Buněčná smrt může být přirozená (doprovázející vývoj neurálních buněk), nebo jako důsledek nedostatečného zásobení buněk uvnitř neurosféry kyslíkem, živinami a růstovými faktory.

Apoptóza se projevuje povrchovými a nitrobuněčnými změnami. Povrchové změny zahrnují zakulacení a svaštění buňky, ztrátu adherence a buněčných kontaktů. K nitrobuněčným změnám patří kondenzace cytoplazmy, rozpad cytoskeletu a změny jádra (kondenzace chromatinu, pyknóza a karyorhexe).

K průkazu spontánního diferenciačního potenciálu (multipotence) NSCs *in vitro* se používá tzv. diferenciacní esej („*differentiation assay*“). Neurosféra představující klon buněk vzniklých proliferací NSCs se přenesou do kultivačních nádobek potažených látkami usnadňujícími adhezi s kultivačním médiem bez růstových faktorů s přidáním séra (Filip et al., 2006). V těchto podmínkách mohou buňky neurosféry přilnout k povrchu kultivační nádoby. Z adherovaných neurosfér vycestovávají nezralé buňky a migrují do určité vzdálenosti, vytvářejí monolayer a vyžívají. Diferencované buňky se morfologicky odlišují. Buňky, které zůstanou v těsné blízkosti neurosféry jsou bipolární, vysílají své dlouhé výběžky radiálně od středu sferoidu a připomínají radiální glii. V těsném kontaktu s jejich výběžky lze zachytit menší migrující elementy cestující podél výběžků radiálně uspořádaných buněk. Buňky na okraji kolonie se oplošťují a mají krátké výběžky, zatímco jiné zůstávají hvězdicovité.

Diferencují se nejen migrující buňky, ale i buňky dosud setrvávající uvnitř neurosfér. Buňky v této kultuře jsou schopné diferencovat se v buňky neuronální, astrocytální i oligodendrocytální linie (Mokřý, 1999).



## 7. ZÁVĚR

Záměrem mojí práce byla kultivace neurálních kmenových buněk izolovaných z embryonální mozkové tkáně myši. Výhodou kultivace NSCs formou monolayeru, kdy se buňky šíří po ploše kultivační nádoby, je snadné pozorování jednotlivých buněk za použití mikroskopu s fázovým kontrastem. Růst NSCs v ploše ale není pro tyto buňky přirozený a neodpovídá tedy zcela vývoji nervové tkáně v živém organismu. Naopak volně plovoucí neurosféry, umožňující svým buňkám formování prostorových interakcí, představují unikátní trojrozměrný model neurogeneze *in vitro*. Uvnitř volně plovoucích neurosfér mohou buňky postupně vyzrávat v neurony, astrocyty a oligodendrocyty, a to i za přítomnosti růstových faktorů EGF a bFGF. Nález pozvolné a spontánní diferenciaci NSCs uvnitř neurosfér dokládá přirozenou schopnost těchto buněk produkovat progenitory pro jednotlivé buněčné linie vyskytující se v dospělém CNS. Pravidelným pasážováním NSCs zamezíme nerušený průběh diferenciaci a umožníme tak zachovat jejich nezralý fenotyp. Uvnitř neurosfér jsme navíc zachytili i buňky v různých fázích buněčné smrti. Tomu odpovídá nález pyknotických jader, fragmentů kondenzovaného chromatinu a zbytků rozpadlých buněk. Další možností při kultivaci neurosfér je jejich přenos na adhezivní substrát do média obsahujícího sérum. NSCs zde dokládají schopnost migrovat, rozprostřít se do monolayeru a diferencovat se.

V průběhu řešení této práce jsem si osvojila metodiku izolace a kultivace myších NSCs. Zvládla jsem chirurgické techniky odběru mozku z myších embryí a jejich následnou disociaci na jednotlivé buňky, přípravy kultivačních médií a misek. Vyzkoušela jsem si způsoby udržování izolovaných NSCs *in vitro* včetně pasážování mechanickou disociací nebo za použití enzymů, a zdokonalila se v metodice histologického zpracování tkání pro světelnou mikroskopii. Nabyté schopnosti a zkušenosti uplatňuji při práci na Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové, jehož pracovníci se mimo jiné zabývají studiem neurálních kmenových buněk a jejich možným využitím např. při terapii roztroušené mozkomíšní sklerózy.

## 8. LITERATURA

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.

BJORNSON, C. R. R., RIETZE, R. L., REYNOLDS, B. A., MAGLI, M. C., VESCOVI, A. L. Turning brain into blood: adult neural stem cells adopt a hematopoietic fate in vivo. *Science*, 1999; 283: 534-537.

DUSPIVOVÁ, D., MOKRÝ, J. Plasticita kmenových buněk: aktuální poznatky. *Lék. Zpr. LF UK Hradec Králové*, 2003; 48(1-2): 3-10.

FILIP, S., MOKRÝ, J., HRUŠKA, I. Kmenové buňky: biologie, medicína, filozofie. Galén, Praha, 2006. 223 s. ISBN 80-7262-401-6.

GALLI, R., BORELLO, U., GRITTI, A. et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nature Neurosci*, 2000; 3: 986-991.

GREIDER, S. W., BLACKBURN, E. H. Telomeres, telomerase and cancer. *Scientific American*, 1996; 1: 80-85.

GRITTI, A., COVA, L., PARATI, E. A., GALLI, R., VESCOVI, A. L. Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett*, 1995; 185: 151-154.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., KELLEY, R. O. Základy histologie. H&H, Praha, 1999. 502 s. ISBN 80-85787-37-7.

KONRÁDOVÁ, V., UHLÍK, J., VAJNER, L. Funkční histologie. H&H, Praha, 2000. 291 s. ISBN 80-86022-80-3.

MOKRÝ, J. Neurální prekurzorové buňky a jejich kultivace. Galén, Praha, 1999. 172 s. ISBN 80-85824-98-1.

MOKRÝ, J. Nové poznatky o kmenových buňkách. *Lék. Zpr. LF UK Hradec Králové*, 2000; 45 (5-6): 133-140.

ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001; 410: 701-705.

RAJAMARAN, R., GUERNSEY, D. L., RAJAMARAN, M. M., RAJAMARAN, S. R. Stem cells, senescence, neiosis and self-renewal cancer. *Cancer Cell International*, 2006; 6: 1-25.

REYNOLDS, B. A., TETZLAFF, W., WEISS, S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 1992; 12: 4565-4574.

SOUKUP, T., KARBANOVÁ, J., MOKRÝ, J., SUCHOMEL, P. Kmenové buňky: současný stav laboratorního výzkumu a perspektivy léčby míšního poranění. *Neurologie pro praxi*, 2005; 2: 64-68.

SPRANDLING, A., DRUMMOND-BARBAROSA, D., KAI, T. Stem cells find their niche. *Nature*, 2001; 414: 98-104.

SVENDSEN, C. N., FAWCETT, J. W., BENTLAGE, C., DUNNETT, S. B. Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. *Exp Brain Res*, 1995; 102: 407-414.