

On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů

Čedíková M., Krakorová K., Miklíková M., Hronová M.,
Balandová A., Pitule P., Králíčková M.

Práce byla podpořena grantem FRVŠ G3 835/2012

Název: On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů

Autor: MUDr. Miroslava Čedíková,

MUDr. Kristýna Krakorová,

MUDr. Michaela Miklíková,

Markéta Hronová,

Alžběta Balandová

Mgr. Pavel Pitule,

Doc. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.

Pracoviště: Ústav histologie a embryologie

Recenzent:

Počet stran: 37

Vydala: Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze

Slovo na úvod

Vážení studenti a kolegové,

Do rukou se Vám dostává zcela nový výukový materiál, jehož posláním je seznámit čtenáře se základními pojmy z oblasti kmenových buněk, tkáňových kultur a se základy laboratorní práce s nimi. Jednoduchou formou Vám budou představeny kmenové buňky jako takové, budete seznámeni s možnostmi jejich pěstování, diferenciací a s následným imunocytochemickým barvením.

Věřím, že Vám bude příručka nápomocná při studiu i při získávání všeobecného medicínského rozhledu. Na základě Vaší odezvy ji bude možné doplňovat o další materiály, které byste při vašem dalším vzdělávání ocenili.

V Plzni, 25.11.2012, za kolektiv autorů Miroslava Čedíková

••

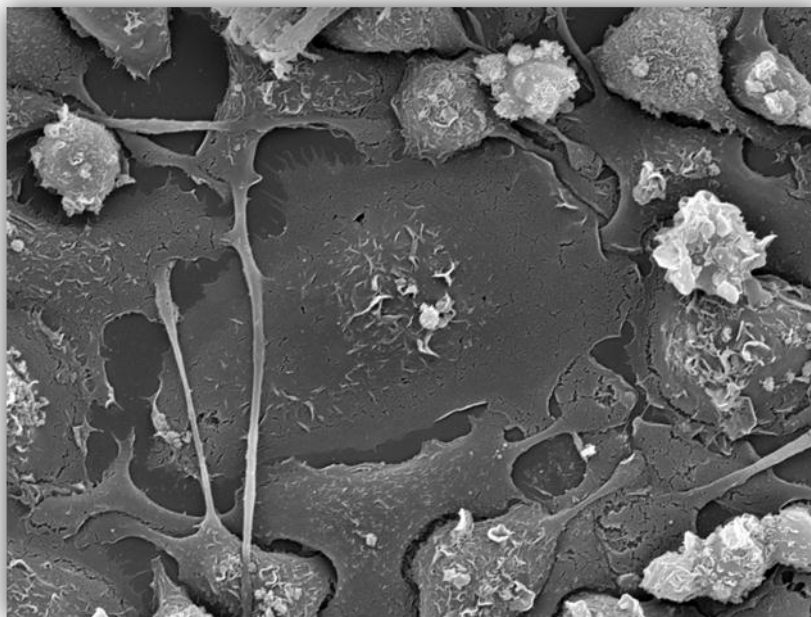
Obsah

1	Tkáňové kultury – obecné seznámení	5
2	Kmenové buňky	11
2.1	Embryonální kmenové buňky	12
2.2	Adultní kmenové buňky.....	14
2.2.1	Mesenchymální kmenové buňky (MSC)	14
2.2.2	Hematopoetické kmenové buňky	19
2.2.3	Kmenové buňky pupečnickové krve.....	20
2.3	Nádorové kmenové buňky	21
2.4	Indukované pluripotentní kmenové buňky	24
3	Kultivace a diferenciaci kmenových buněk	25
3.1	Kultivace a neurodiferenciaci	25
3.1.1	Kultivace	25
3.1.2	Neurodiferenciaci	25
3.2	Kardiodiferenciaci.....	27
4	Imunocytochemické barvení	30
5	Zdrojová literatura.....	35

1 Tkáňové kultury – obecné seznámení

Tkáňové kultury reprezentují jeden ze stěžejních experimentálních přístupů současné medicíny. Jedná se o kultivaci částí tkání či jednotlivých buněčných linií v podmínkách *in vitro*, tedy v prostředí, kde můžeme pro kultivaci zajistit stabilní podmínky.

Velkým mezníkem v pěstování buněčných linií byl rok 1951, přesněji 8. únor tohoto roku, kdy byla získána první lidská buněčná linie - byla izolována z karcinomu děložního čípku od pacientky Henrietty Lacks, podle níž dostala i své jméno - HeLa. Dodnes se jedná o jednu z nejpoužívanějších buněčných linií.



Obrázek 1: Buňky kostní dřeně pěstované *in vitro*, (elektronový skenovací mikroskop)

Ke kultivaci buněk v tkáňové kultuře je nezbytná speciálně vybavená laboratoř. Ta musí být pečlivě navržena a zařízena dobře omyvatelným vybavením a slouží výlučně jen pro laboratorní účely. Bývá vybavena filtrem proudícího vzduchu a UV lampou, která po skončení denních prací slouží k hubení mikroorganismů. Vzduch v laboratoři by měl za pomoci speciálních zařízení cirkulovat tak, aby celý jeho objem prošel světlem zářiče a došlo k jeho plnému očištění. Personál je povinen používat obuv a oděv určený výhradně pro práci v laboratoři.

Veškerá manipulace s tkáňovými kulturami probíhá ve speciálních přístrojích – **laminárních boxech** (sterilní box, flow box, obrázek 2). Toto zařízení výrazně snižuje, až znemožňuje kontaminaci buněk bakteriemi a jinými nežádoucími mikroorganismy. Laminární proudění v boxu udržuje vzduch v pohybu a filtruje ho tak, aby byl stále čistý. Přesto je při práci v boxu potřeba používat rukavice a pečlivě dezinfikovat všechny věci, které jsou do boxu vneseny. Před každým použitím se navíc používá UV lampa, která zneškodní i odolnější

mikroorganismy. Jen dodržováním tohoto postupu se docílí čistého a bezpečného prostředí pro práci s buněčnými kulturami.



Obrázek 2: Laminární box

Druhým nepostradatelným přístrojem v laboratoři tkáňových kultur je tzv. **inkubátor** (obrázek 3). Toto zařízení zvenčí nikoli nepodobné lednici má za úkol udržovat uvnitř stále stejné prostředí tak, aby buňky, se kterými se právě nepracuje, mohly žít v prostředí co nejpodobnějším podmínkám původního organismu. Zásadním parametrem je teplota, optimální pro většinu buněk je kultivace při teplotě 36,5-37 °C. Dalšími důležitými parametry jsou vlhkost a zvýšené zastoupení CO₂. Vlhkost se udržuje okolo 95%, aby se množství média v kultivační nádobě nezmenšovalo a zachovávalo relativně stálý objem. Tenze CO₂ je udržována na 5%.

Ke sledování růstu buněk, jejich kolonií a kontrole, zda buněčná kultura není kontaminována jinými mikroorganismy, slouží tzv. **invertovaný mikroskop**. Od klasického mikroskopu se liší tím, že objektivy jsou uloženy ve spodní části mikroskopu a díky soustavě zrcadel je nám umožněno pozorovat buňky zespodu. Důvodem je, že většina buněk roste přisedle (adherentně) a díky pohledu zdola není nutné k jejich pozorování překonávat mnohdy značně vysokou masu kultivačního média.

Médium je roztok určený k výživě a ochraně buněk (obrázek 4). Poskytuje buňkám substrát potřebný k životu i růstu.

Většina současných médií obsahuje také fenolovou červeň, která je indikátorem pH. Výzkumník pracující s buňkami díky ní snadno rozpozná změnu pH, která již může být pro buňky škodlivá. pH se mění vlivem metabolitů, které buňky vylučují do svého okolí. Vzhledem k absenci v organismu běžného odplavování zplodin krví, je potřeba médium často měnit, abychom alespoň částečně tento proces nahradili. Pokud se červeň média zbarví do

fialova, znamená to, že se médium stává zásaditější, naopak zesvětlování média od červené (pH 7,4) přes oranžovou (pH 7,0) až do žluta (pH 6,5) značí pokles pH.

Složení nejčastěji používaných médií:

MEM – Minimal Essential medium (Eaglovo medium); obsahuje vodu, esenciální aminokyseliny, vitamíny a soli.

DMEM – Dulbeccova modifikace MEM; obsahuje dvakrát tolik aminokyselin jako MEM, čtyřikrát více vitamínů a dvakrát tolik CO_2 a HCO_3^- pro lepší pufrovací výsledky.

Alfa MEM - má oproti MEM více aminokyselin a vitamínů, stejné množství nukleosidů a navíc obsahuje kyselinu lipovou.



Obrázek 3: Inkubátor pro kultivaci tkáňových kultur



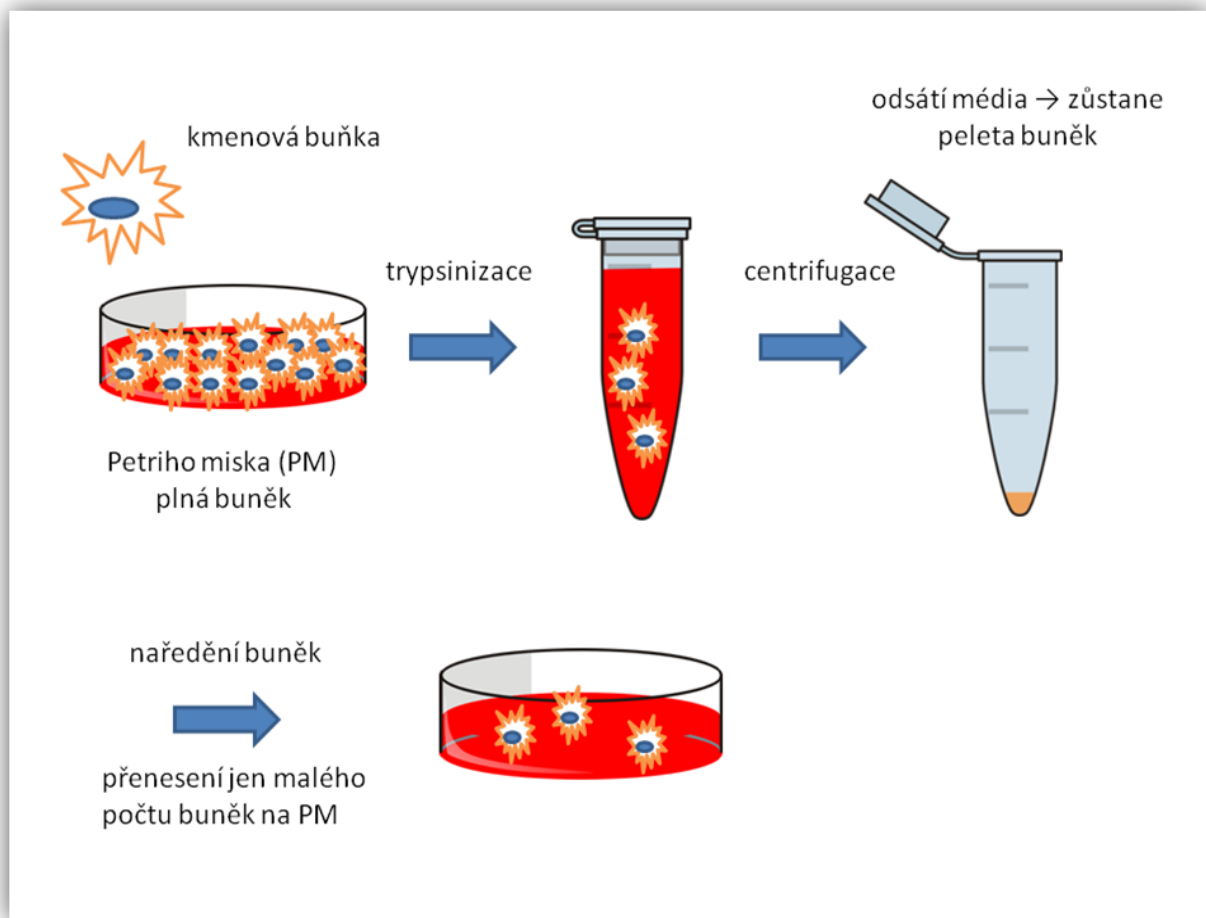
Obrázek 4: Média pro kultivaci tkáňových kultur

Většina buněčných kultur potřebuje ke své proliferaci kontakt s podkladem – rostou tedy tzv. adherentně a postupně pokryjí celé dno **kultivační nádoby** (kultivační lahve, Petriho misky (PM) či vícejamkové destičky – obrázek 5) – vytvoří tzv. **monolayer**. V tomto stádiu již není možná jejich další proliferace a je nutné přistoupit k **pasáži**.

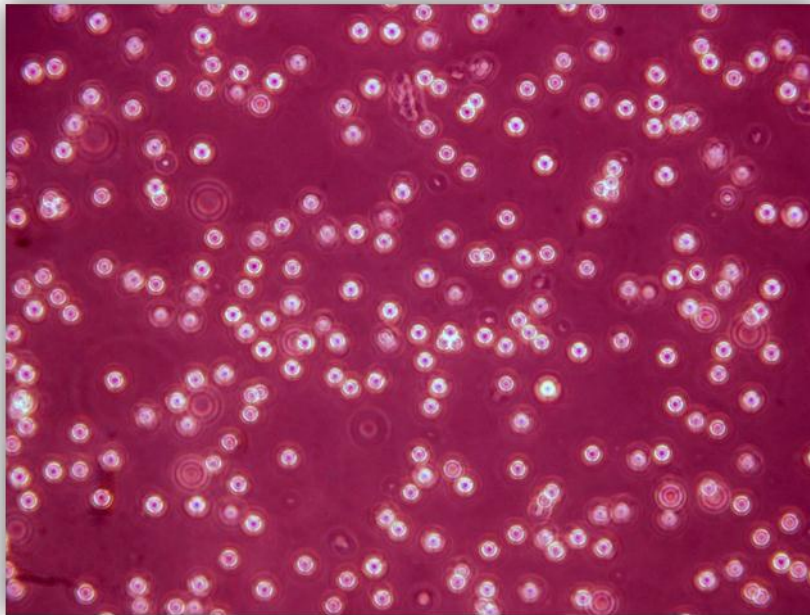
Pasážováním se rozumí přenesení pouze části buněčné populace z kultivační nádoby, kde již buňky dospěly do stádia monolayeru, do nové. Schéma pasážování je znázorněno na obrázku 6. Na obrázcích 7 a 8 je zachycen vzhled buněk ihned po pasáži a 24 hodin po ní, kdy již buňky opět rostou adherentně.



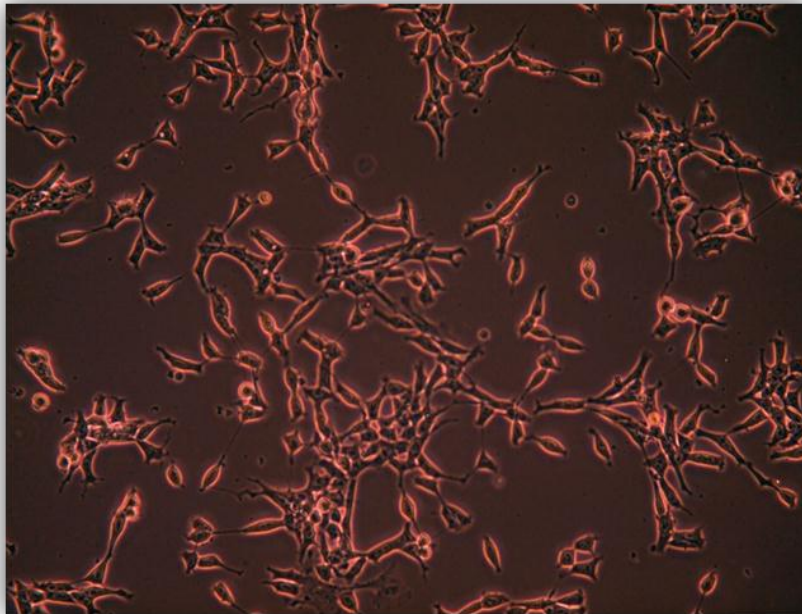
Obrázek 5: Kultivační nádoby – kultivační lahve, misky a destičky



Obrázek 6: Pasážování – adherentní buňky narostlé na Petriho misce (PM) do monolayeru jsou rozvolněny pomocí trypsinu. Po přidání média se sérem (k zastavení štěpící reakce) je suspenze buněk přenesena do zkumavky a centrifugována. Poté je odsáto médium a k peletě buněk přidáno nové. Ze vzniklé suspenze je přenesena jen malá část na novou PM.



Obrázek 7: Buňky přenesené na novou kultivační misku ihned po pasáži, zvětšeno 20x

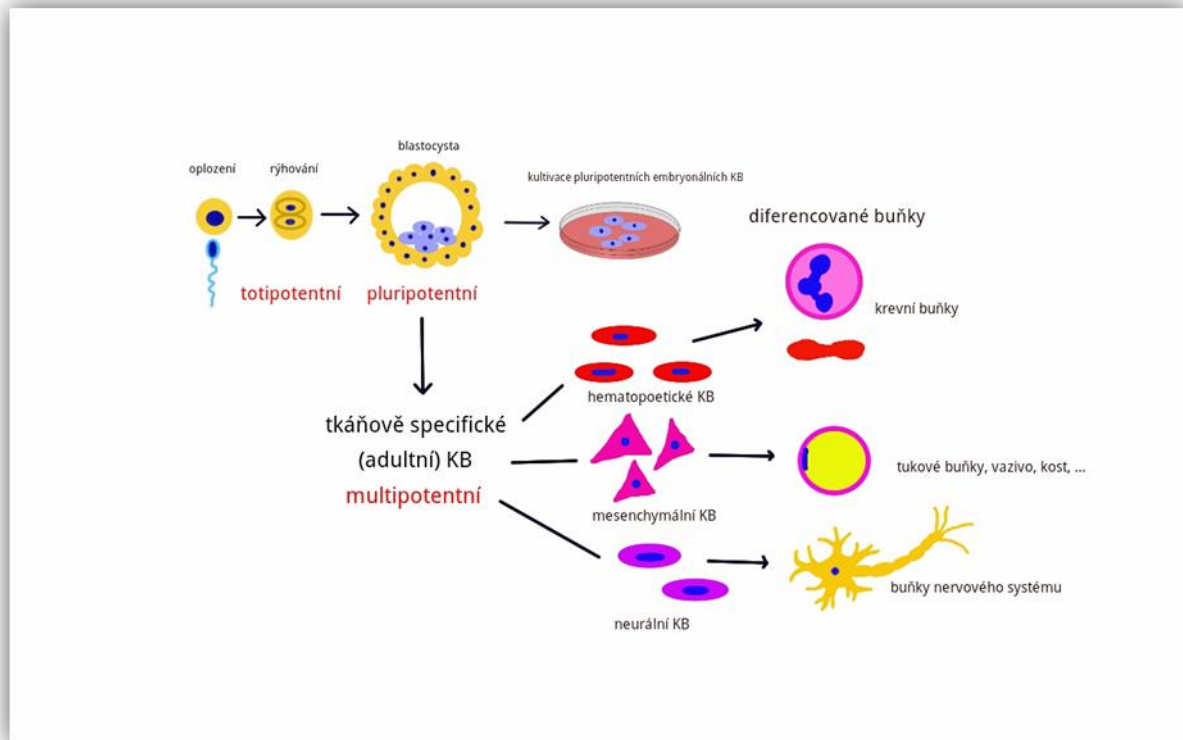


Obrázek 8: Buňky 24 hodin po pasáži – adherované k podkladu, zvětšeno 20x

2 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou primární nediferencované buňky, které mají schopnost diferencovat se (přeměnit se) na jakýkoliv jiný typ buněk. Mají tedy schopnost vytvářet nové buňky a opravovat poškozené nebo opotřebované části orgánů a tkání v těle. Zároveň mohou obnovovat i samy sebe. Základní rozdělení kmenových buněk je znázorněno na obrázku 9.

Kmenové buňky se dělí na **embryonální kmenové buňky** a **adultní kmenové buňky** (ty jsou někdy nazývány jako tkáňově specifické kmenové buňky či neembryonální kmenové buňky). Embryonální kmenové buňky jsou získávány z vývojových stádií oplodněného vajíčka – tj. z doby než dojde k jeho implantaci v děloze. Naopak adultní kmenové buňky nalézáme již v diferencovaných tkáních a orgánech. Mezi tento typ buněk patří např. *mesenchymální a hematopoetické kmenové buňky*.



Obrázek 9: Schéma znázorňující základní rozdělení kmenových buněk

Zvláštním a nejnověji objeveným typem jsou *indukované pluripotentní kmenové buňky*, které jsou uměle vytvořené z diferencovaných buněk lidského těla.

Kmenové buňky můžeme také dělit z hlediska jejich diferenciačního potenciálu (do jakých typů buněk jsou schopné se přeměnit) na buňky:

- **TOTIPOTENTNÍ** - mohou se přeměnit v jakýkoliv typ buněk jedince včetně extraembryonálních tkání - placenta, pupečník, embryonální obaly a zároveň i další totipotentní buňky.
- **PLURIPOTENTNÍ** - mají schopnost diferencovat se do buněk všech tří zárodečných listů (ektodermu, entodermu a mesodermu) – tzv. do jakékoliv buňky lidského těla, dále do sebe sama, ale ne již do buňky totipotentní (příkladem jsou např. embryonální kmenové buňky).
- **MULTIPOTENTNÍ** - mohou se diferencovat pouze do příbuzných buněk danému typu buňky, př. hematopoetické kmenové buňky, mesenchymální kmenové buňky.
- **PROGENITOROVÉ** (unipotentní) - mohou produkovat pouze jediný typ buněk, ale je jim ponechána schopnost sebeobnovy.

Nika kmenové buňky (niche)

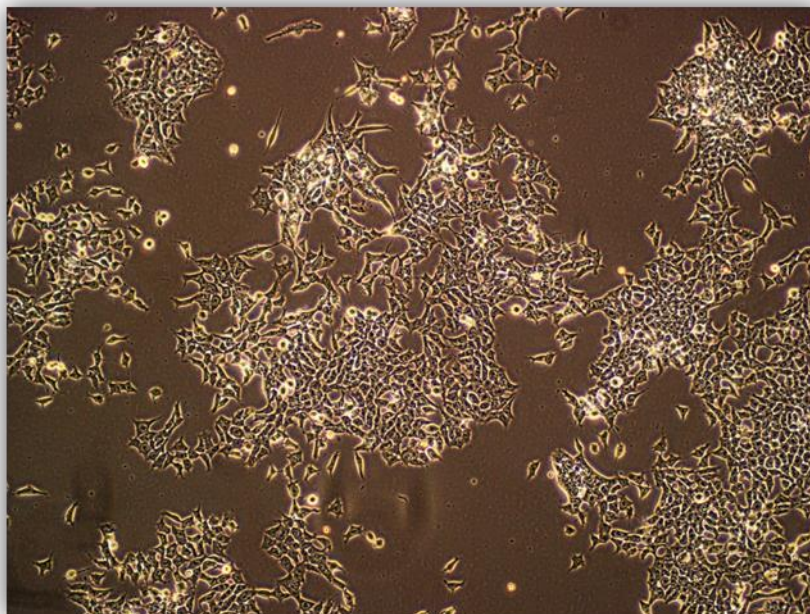
Jedná se o speciální mikroprostředí, v němž sídlí kmenové buňky. Toto prostředí jim zajišťuje nejen výživu, ale zároveň je ochraňuje před diferenciačními a apoptotickými signály z okolí. Zabraňuje i nadměrné stimulaci proliferace buněk, která by mohla vyústit v nádorové bujení.

2.1 Embryonální kmenové buňky

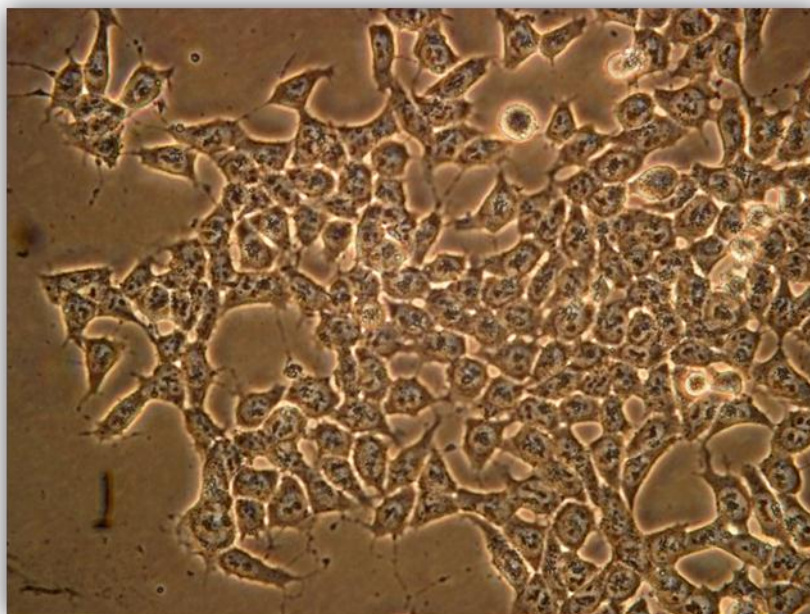
Embryonální kmenové buňky (ESC) jsou pluripotentní buňky, mohou se tedy diferencovat do všech tří zárodečných listů (ektodermu, entodermu a mesodermu), zároveň i do sebe sama. Markery pluripotence jsou např. Nanog, Oct 3/4.

Jsou odvozené z embryoblastu blastocysty, tedy z raného stádia oplodněného vajíčka. První lidské ESC byly izolovány v roce 1998, naproti tomu myši již mnohem dříve – v roce 1981.

Jejich potenciál ve světě vědy je obrovský (reparace tkání, transplantace), doteď ale není vyřešena problematika s jejich případným nekontrolovatelným růstem a s tím spojenou přeměnou na nádorové bujení. Dalším problémem u lidských ESC je otázka etická. Kultivované ESC jsou vidět na obrázcích 10 a 11.



Obrázek 10: Myší embryonální kmenové buňky kultivované na PM, zvětšeno 10x



Obrázek 11: Myší embryonální kmenové buňky kultivované na PM, zvětšeno 20x

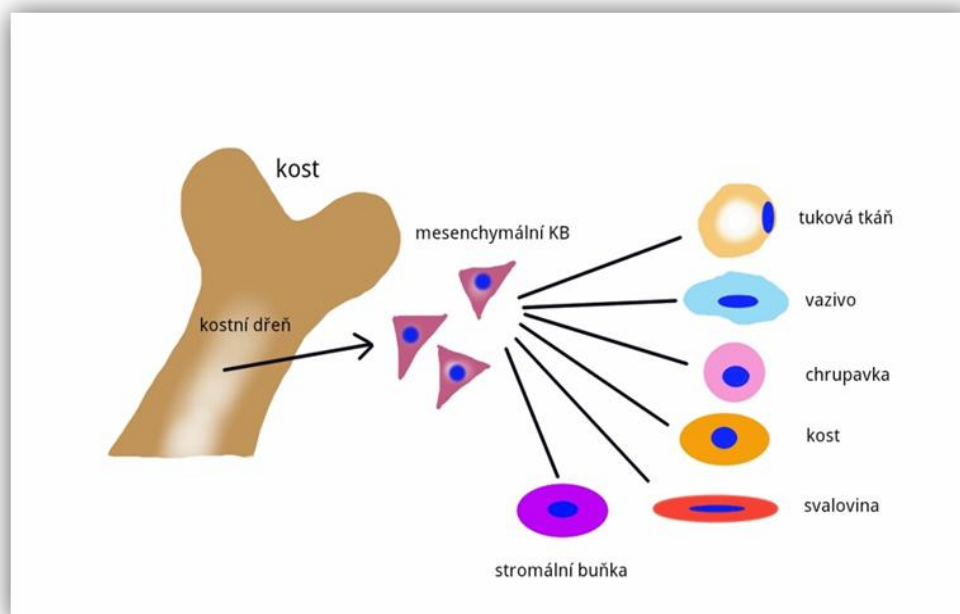
2.2 Adultní kmenové buňky

Adultní (somatické) kmenové buňky jsou multipotentní nediferencované kmenové buňky, vyskytující se v již diferencovaných tkáních a orgánech, kde se podílejí na opravě a údržbě. Mohou tedy diferencovat do některých či všech specializovaných buněčných typů v dané tkáni či orgánu. Příkladem mohou být např. mesenchymální (MSC) a hematopoetické kmenové buňky.

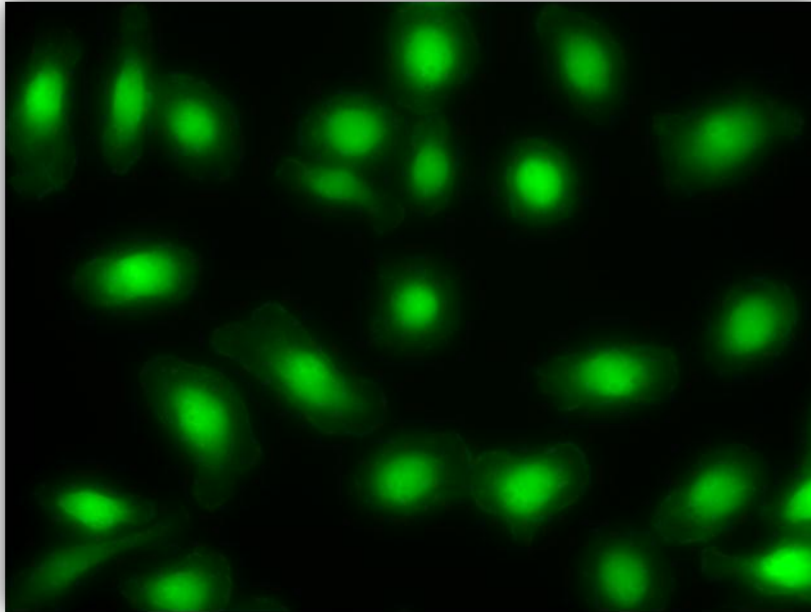
2.2.1 Mesenchymální kmenové buňky (MSC)

Jsou to multipotentní kmenové buňky se schopností sebeobnovy a zároveň diferenciací do osteoblastů, chondroblastů, myoblastů, fibroblastů, adipocytů a stromálních buněk (obrázek 12). Na obrázcích 13, 14, 15 jsou ukázány nediferencované MSC, naopak na obrázku 16, 17 a 18 již diferencované do adipocytů.

MSC jsou definovány jako nehematopoetické (primárně neschopné tvořit buňky krevní řady) kmenové buňky, vyznačují se expresí povrchových markerů: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 a CD106. Naopak u nich nenalezneme povrchové markery CD31, CD33, CD34 nebo CD45, které jsou typické pro hematopoetické kmenové buňky. Ukázka vyšetření markerů MSC pomocí průtokové cytometrie je znázorněna na obrázku 19.



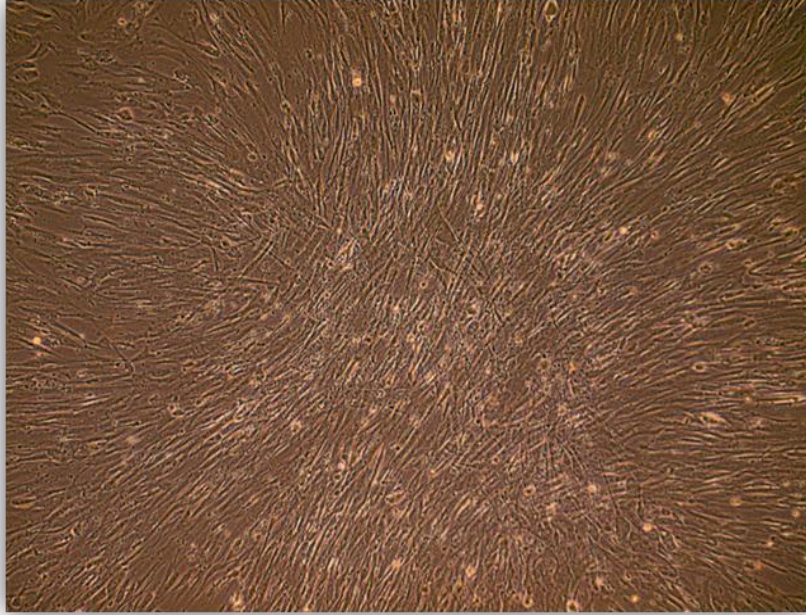
Obrázek 12: Mesenchymální kmenové buňky



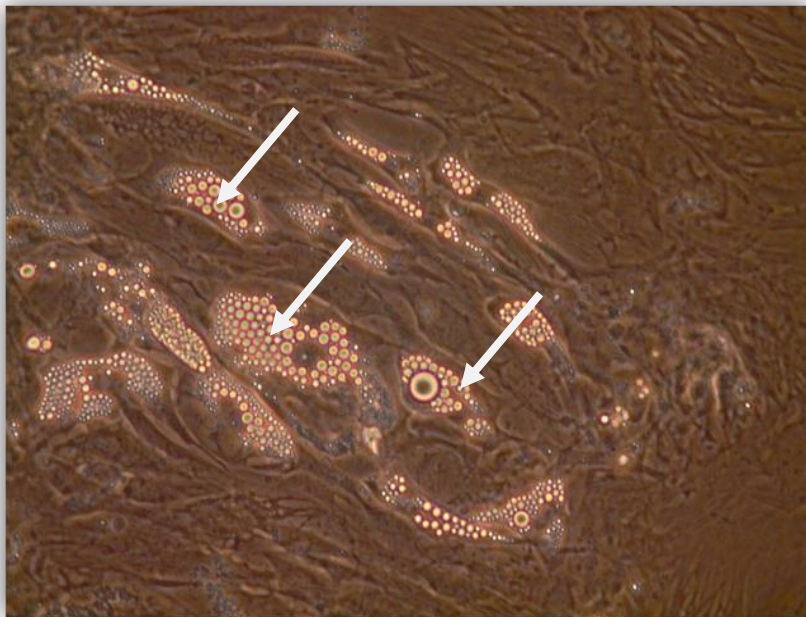
Obrázek 13: Myší mesenchymální kmenové buňky pozitivní na zeleně fluoreskující protein (GFP), zvětšeno 20x



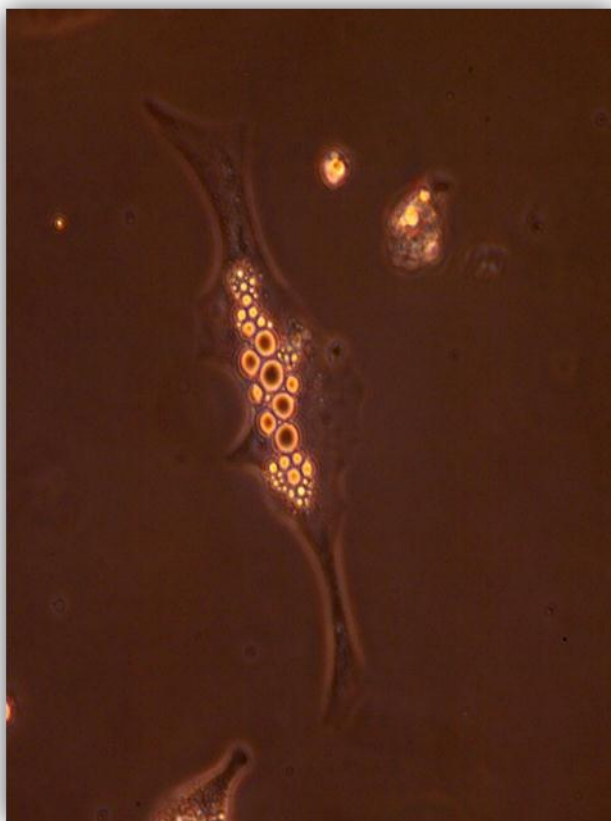
Obrázek 14: Mesenchymální kmenové buňky kultivované na PM, zvětšeno 20x



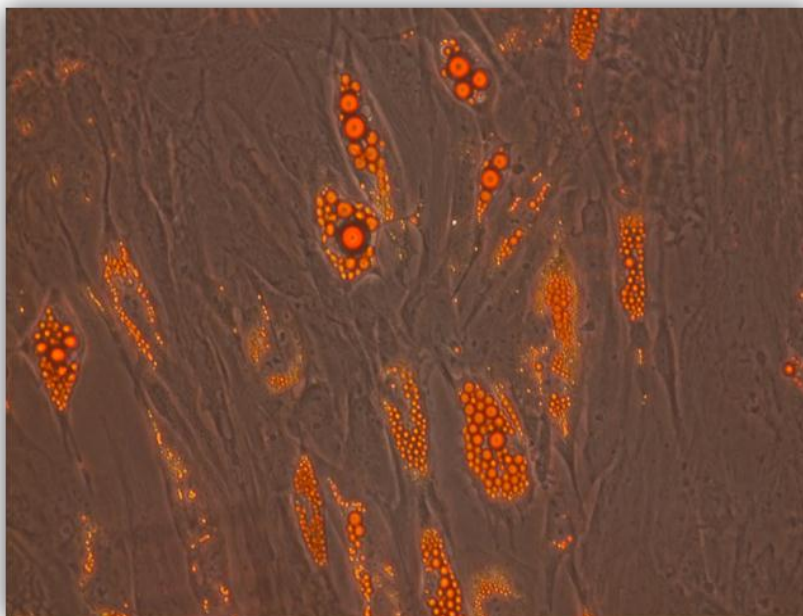
Obrázek 15: Monolayer mesenchymálních kmenových buněk, zvětšeno 20x



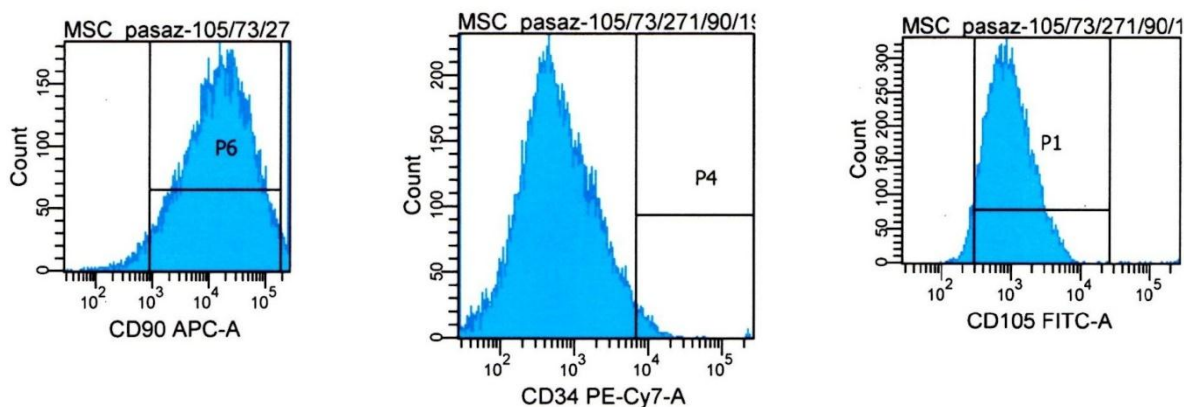
Obrázek 16: Adipocyty vyplněné tukovými vakuolami (označeny šipkou), zvětšeno 20x



Obrázek 17: Adipocyt vyplněný tukovými vakuolami, zvětšeno 40x



Obrázek 18: Adipocyty – tukové vakuoly nabarveny pomocí barvení „oil red“, zvětšeno 20x



Obrázek 19: Ukázka vyšetření markerů MSC pomocí průtokové cytometrie (markery CD90, CD105 a CD34).

Ve tkáni se vyskytují v „niche“, v prostorech, kde mají kmenové buňky ideální prostředí pro svoji existenci. Pokud je niche zničena nebo narušena, MSC ztrácí vlastnosti kmenové buňky a diferencuje se do běžné buňky tkáně, ve které se nachází. Pokud je zničena kmenová buňka, avšak niche zůstane nedotčena, brzy niche osídlí jiná kmenová buňka. Počet MSC je tedy regulován počtem niche.

Podle současných výzkumů hrají MSC roli v regeneraci tkání všech zárodečných listů. Pomáhají regenerovat poranění kožního krytu, mají účinky i na nervový systém - byla prokázána jejich podpůrná regenerační funkce na poškozených periferních neuronech, podobně jako na poraněné míše. Zkoumá se jejich možný vliv na mozkovou tkáň postiženou např. u Parkinsonovy choroby.

Dále byly popsány jejich účinky při reparaci a novotvorbě chrupavky a hojení kostních defektů.

Pomáhají regenerovat a nově tvořit hepatální tkáň, studuje se jejich vliv na vaskulární choroby. Slibně se jeví i jejich možný příspěvek k léčbě diabetes mellitus a jeho následků - neuropatie, vaskulopatie a diabetická noha.

Další z vlastností MSC je jejich imunomodulační schopnost. V této souvislosti jsou zkoumány například jako prostředek v boji proti GvHD (graft versus host disease = reakce štěpu proti hostiteli).

Imunosupresivní efekt se využívá ve výzkumu léčby řady onemocnění, jako např. diabetes mellitus, artritida, roztroušená skleróza a systémový lupus erythematoses.

Zajímavost: V anglické literatuře je slovo mesenchymální často považováno za synonymum slova mezodermální. U nás tyto pojmy rozlišujeme. Mezoderm je střední zárodečný list, zatímco mesenchym je pojivová a podpůrná tkáň.

2.2.2 Hematopoetické kmenové buňky

Hematopoetické kmenové buňky (HSC) jsou multipotentní kmenové buňky se schopností sebeobnovy a zároveň diferenciací do buněk krevní řady. Po zničení kostní dřeně jsou schopné ji plně nahradit a zajistit tak dlouhodobou produkci všech krevních elementů. Vyznačují se expresí povrchových markerů CD31, CD33, CD34 a CD45.

V těle se vyskytují ve stromatu kostní dřeně. Zde se množí a diferencují. Vyskytují se zde v počtu 1 HSC na 100 000 jiných buněk. V periferní krvi je jejich počet řádově nižší.

Z tohoto důvodu byl dříve suverénní metodou získu HSC odběr kostní dřeně (nejčastěji z lopaty kosti kyčelní). Avšak tento způsob v současnosti ustupuje do pozadí. Jeho alternativou je mobilizace HSC z kostní dřeně užitím cytokinů (granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)) a jejich izolace pomocí separátoru z periferní krve.

Nejčastějším zdrojem HSC jsou tedy v současnosti kostní dřeň, periferní krev, ale využívá se také odběr pupečnickové krve či odběr z jater plodu.

Schopnost HSC tvořit a nahrazovat buňky krevní řady, je dnes využíváno při léčbě leukemií, lymfomů, ale také kostní dřeně zničené po radioterapii a chemoterapii. V tomto směru se využívají jak autologní transplantáty HSC očištěné od dalších buněk, tak transplantáty allogenní od dárců. Dále je prokázán jejich pozitivní vliv na léčbu dědičných metabolických onemocnění (Wiskott-Aldrich syndrom, beta talasemie atd.).

Nově se sleduje jejich potenciál i v protinádorové léčbě. Slibně se jeví HSC léčba na terapii neodpovídajících solidních tumorů plic, ovarií, tlustého střeva, prostaty, či metastatického postižení u rakoviny ledvin.

Dále se HSC užívají v terapii autoimunitních onemocnění jako je diabetes mellitus, revmatoidní artritida a lupus erythematoses.

Zajímavost: HSC je velmi těžké odlišit od leukocytů. Mají stejný vzhled i váhu. Proto bylo v minulosti velmi těžké zjistit jejich množství a vyhodnotit tak úspěšnost odběru. V současnosti se v laboratorních podmínkách rozlišují od dalších buněk podle povrchových markerů (viz. výše).

2.2.3 Kmenové buňky pupečnickové krve

Pupečnicková krev je bohatým a dostupným zdrojem kmenových buněk (KB). Jsou různého druhu – hematopoetické, mezenchymální aj. Největšího významu a využití dosahuje řada hematopoetická, která je zdrojem pro transplantační léčbu. Poměrně nedávno byly objeveny KB non-hematopoetického původu, které jsou pluripotentní – embryonálně podobné kmenové buňky pupečnickové krve. Exprimují pluripotentní transkripční faktor Oct-3/4, který hraje hlavní úlohu při sebeobnově buněk.

Kmenové buňky z pupečníku mají hned několik pozitiv. V první řadě jde hlavně o jejich dostupnost, kdy se po porodu placenta i pupeční šňůra stávají pro matku i dítě nepodstatnou z hlediska aktuálního přežití. Další přednost odběru KB z odloučeného pupečníku je nebolestivost a nulová zátěž pro dítě či matku, a z toho pramenící minimální etické problémy odběru.

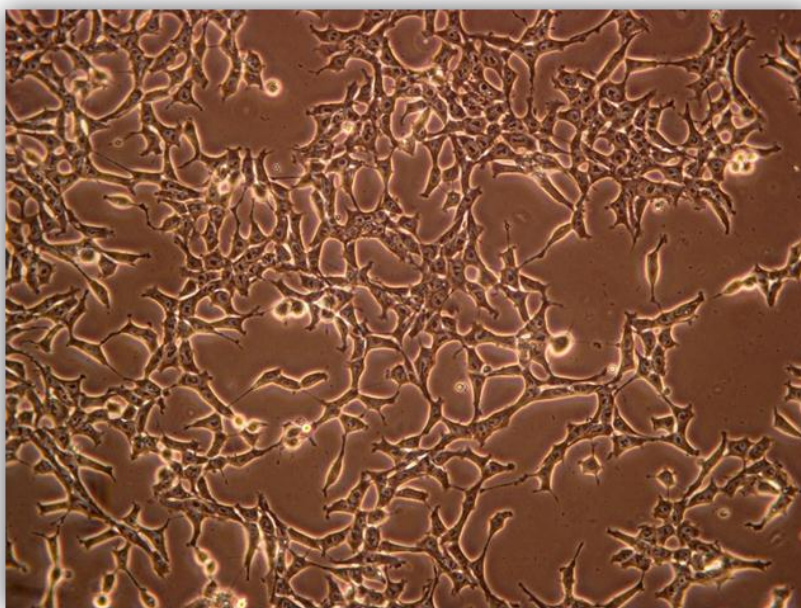
Využití v medicíně zahrnuje široké spektrum léčebných možností, které pupečnicková krev nabízí. První úspěchy slavila transplantace pupečnickové krve v léčbě hematologických malignit, jako jsou leukémie a lymfomy. K důležitým transplantacím KB dochází také po chemoterapiích, kdy je třeba obnovit krvetvorbu. Mezi nemaligní onemocnění, která se dají léčit umbilikální krví, patří například vrozené metabolické poruchy nebo hemoglobinopatie. Aplikace non-hematopoetických KB v praxi je stále ve vývojovém stádiu. Cílem výzkumu těchto buněk je jejich použití při léčbě onemocnění jako např. diabetes mellitus 1. typu, systémový lupus erythematosus nebo dětské mozkové obrny a perinatální hypoxie. Klinické studie se pak také stále častěji zaměřují na autologní transplantace v regenerativní medicíně a na nové možnosti v léčebných postupech.

2.3 Nádorové kmenové buňky

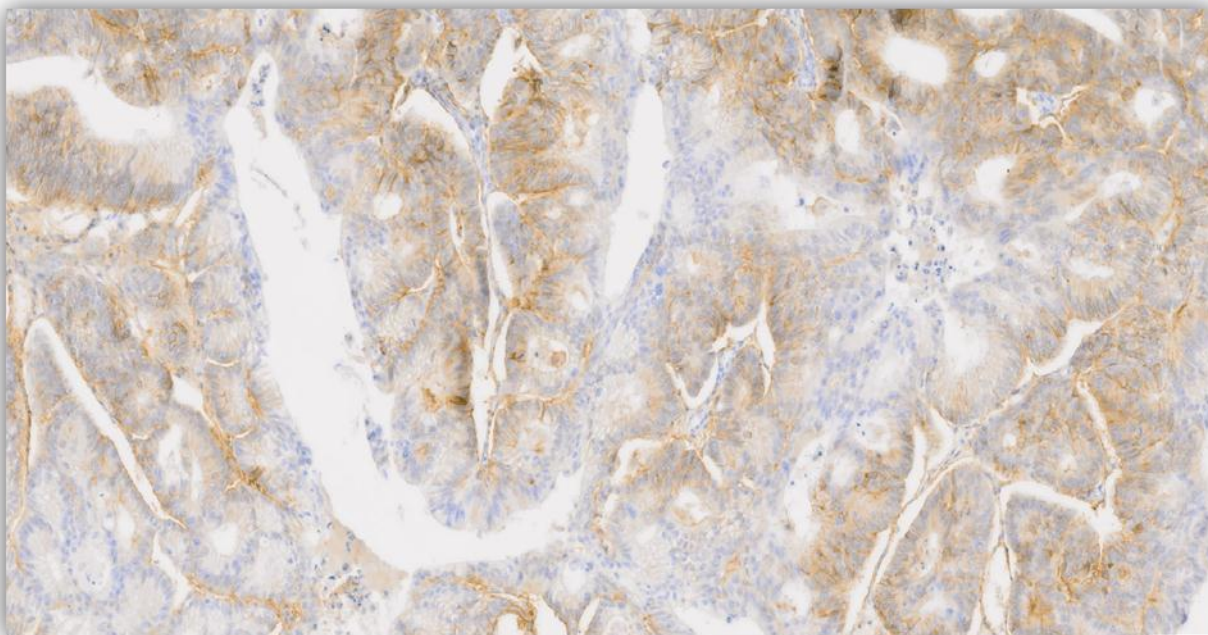
Nádorové kmenové buňky (cancer stem cells, CSC) jsou buňky nacházející se v solidní nádorové tkáni, ale i u hematologických malignit (obrázek 20 – CSC). Jsou velmi pravděpodobně zodpovědné za progres choroby, vznik metastáz a relaps nádorového onemocnění. Není vyloučeno, že jsou přímo odpovědné za vznik nádorového procesu.

Hypotéza o existenci nádorových kmenových buněk se poprvé objevila na konci osmdesátých let, ale první přesvědčivý důkaz byl zveřejněn v roce 1997 v časopise Nature Medicine.

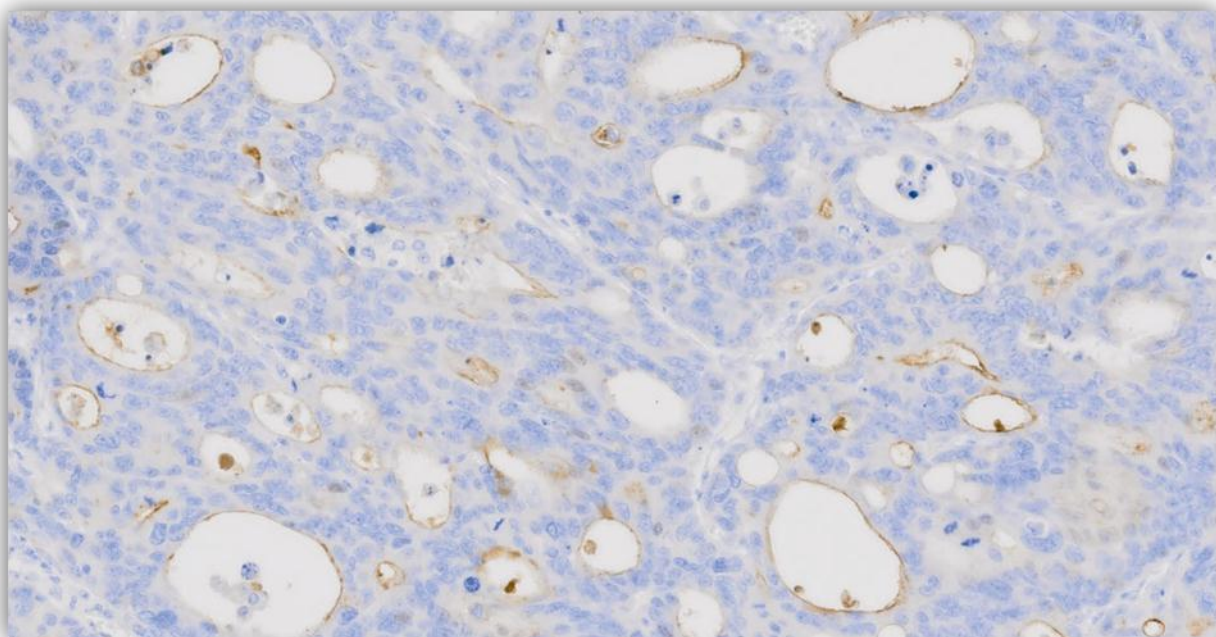
Přítomnost CSC byla prokázána u akutní myeloidní leukémie, ale i u solidních nádorů, konkrétně u nádorů mozku, karcinomu prsu, plic, ovaríí, prostaty, pankreatu, u kolorektálního karcinomu, melanomu a mnohočetného myelomu. Předpokládá se, že se CSC nacházejí ve všech typech zhoubného nádorového bujení. Mezi markery nádorových kmenových buněk patří např. CD 133 a CD44 – obrázek 21 a 22.



Obrázek 20: Nádorové kmenové buňky kultivované na Petriho miskách, zvětšeno 20x



Obrázek 21: Imunohistochemická detekce markerů nádorových kmenových buněk v kolorektálním karcinomu – CD44 (hnědá barva), zvětšeno 10x



Obrázek 22: Imunohistochemická detekce markerů nádorových kmenových buněk v jaterní metastáze kolorektálního karcinomu – CD133 (hnědá barva), zvětšeno 10x

Tyto buňky mají obě základní schopnosti normálních kmenových buněk, tedy schopnost sebeobnovy a diferenciaci v různé buněčné typy. V nádorech tvoří malou subpopulaci, přibližně 0,1 - 1% z celkové buněčné masy nádoru. Přesto je pravděpodobné, že hrají klíčovou roli v chování nádoru, v jeho agresivitě i v resistenci vůči chemoterapeutické léčbě.

Jsou to totiž právě nádorové kmenové buňky, které odolávají chemoterapeutikům, zatímco ostatní buňky některých nádorů jsou na chemoterapii citlivé. Dá se říci, že chemoterapeutická léčba prodlužuje délku přežití pacienta, ale k úplnému vyléčení by vedl přímý zásah proti CSC, bez kterých by nádor ztratil schopnost dalšího růstu a schopnost diseminace.

Otázkou zůstává, kolik CSC je nezbytně nutných k zahájení nádorového bujení. Laboratorní pokusy ukazují, že se jedná řádově tisíce až desetitisíce CSC, ale toto poměrně vysoké číslo může být zkresleno tím, že během transferu buněk z nádorové tkáně do myšího organismu nemusí přežít všechny transferované CSC a nový nádor tak způsobuje populace o mnohem nižším počtu buněk. Životnost transferovaných buněk je také ovlivněna prostředím, do kterého jsou implantovány, a tak tato otázka zůstává zatím otevřena. Nezodpovězená je i otázka původu CSC. Jako nejpravděpodobnější se jeví dvě hypotézy. Buď jde o normální kmenové buňky postižené mutacemi, které jim umožnily získat vlastnosti typické pro nádorové buňky, nebo CSC vznikají z progenitorových buněk. Uvažuje se i nad možností, že jde o dediferenciaci mutovaných buněk jako takových, které získaly vlastnosti kmenových buněk zpětně.

Medicínský význam CSC spočívá v jejich rozhodující roli v chování nádoru. Cílem výzkumů je tedy vyvinout terapii, která by vedla k likvidaci CSC buď na základě jejich typických znaků, nebo takovou léčbu, která by umožnila diferenciaci CSC a tím ztrátu klíčových vlastností pro růst a diseminaci nádoru. Diferencované CSC totiž postrádají schopnost generovat karcinom.

2.4 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Posledním typem kmenových buněk, o kterém se budeme zmiňovat, jsou takzvané indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC). Tyto buňky se svými vlastnostmi nejvíce blíží embryonálním kmenovým buňkám a mají široký diferenciační potenciál. Nejedná se však o buněčný typ, který by bylo možno najít ve vyvíjejícím se či dospělém organismu, ale jsou připravovány uměle cílenou modifikací již diferenciovaných buněk těla, nejčastěji fibroblastů (jako počáteční buněčný typ lze použít i řadu jiných buněk, například hepatocyty, různé krevní či neuronální buňky).

Poprvé byly vytvořeny v laboratoři profesora Yamanaky v roce 2006 pomocí vnesení čtyř transkripčních faktorů specifických pro kmenové buňky (Klf4, c-Myc, Oct3/4 a Sox2) do myšího embryonálního fibroblastu. Vnesené transkripční faktory spustily v takto indukovaných fibroblastech „kmenový“ program, který vzniklým iPSC umožnil růst v embryoidních těliscích (typický způsob růstu kmenových buněk), při podkožní aplikaci do imunodeficientní myši vytvořily teratomy a při vnesení do myší blastocysty se iPSC podílely na vzniku budoucího embrya. Od jejich objevení bylo popsáno mnoho dalších protokolů, kterými je možné iPSC připravit. Rovněž byla potvrzena schopnost diferenciace iPSC do široké škály somatických buněk. Existence iPSC obchází mnohdy nepřekonatelné etické bariéry spojené s výzkumem lidských embryonálních kmenových buněk, jelikož k jejich přípravě stačí v podstatě jakákoliv buňka z těla dospělého jedince. Pro jejich praktické využití, především v regenerativní medicíně, je ještě nutné překonat řadu problémů, například omezit množství vznikajících chromosomálních změn a mutací při generování iPSC, či se vyvarovat používání potenciálně onkogenních transkripčních faktorů, které jsou ale v indukci pluripotence neúčinnější. Každopádně však iPSC umožnily nový pohled na hierarchii buněčných typů v dospělém organismu a otevřely dveře pro mnoho nových směrů výzkumu.

3 Kultivace a diferenciaci kmenových buněk

3.1 Kultivace a neurodiferenciaci

3.1.1 Kultivace

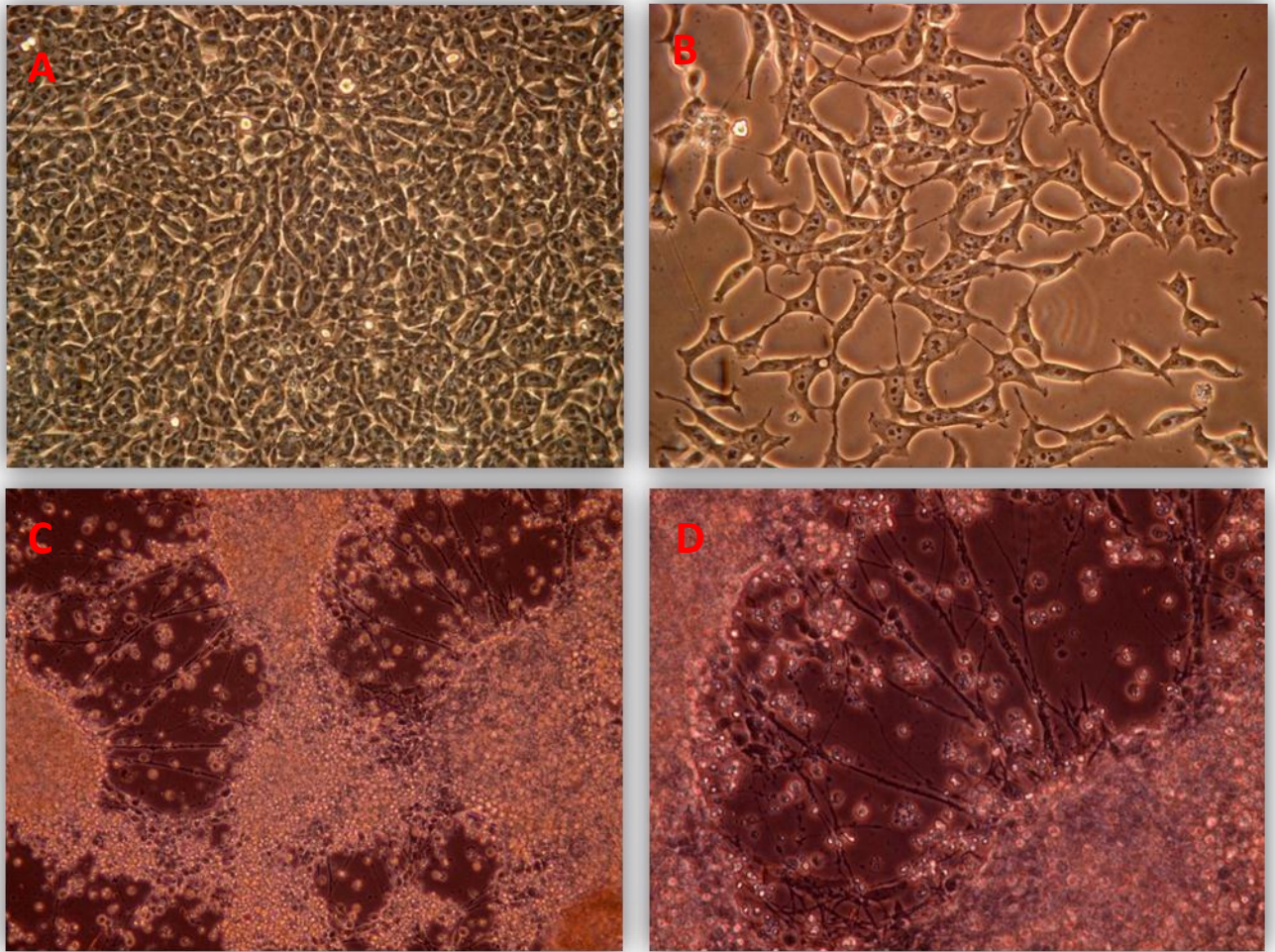
Základní nediferencované kmenové buňky (v našem případě embryonální nádorové kmenové buňky linie P19) jsou kultivovány na tkáňových kultivačních miskách, potažených 0,1% vodným roztokem želatiny, v Dulbecco`s modified Eagle`s médiu (DMEM), s obsahem 10% fetálního telecího séra, 0,1 mg/ml L – glutaminu, 0,05 mM β-merkaptotanolu, 100 i.u./ml penicilinu a 0,1 mg/ml streptomycinu.

Buňky jsou kultivovány v plastových miskách, lahvích nebo destičkách. Pokud buňky porostou celý povrch kultivační nádoby – vytvoří tzv. monolayer, musí dojít k pasáži (přenesení části buněk na jinou kultivační nádobu). Podrobněji se tomuto tématu věnuje první kapitola – Tkáňové kultury.

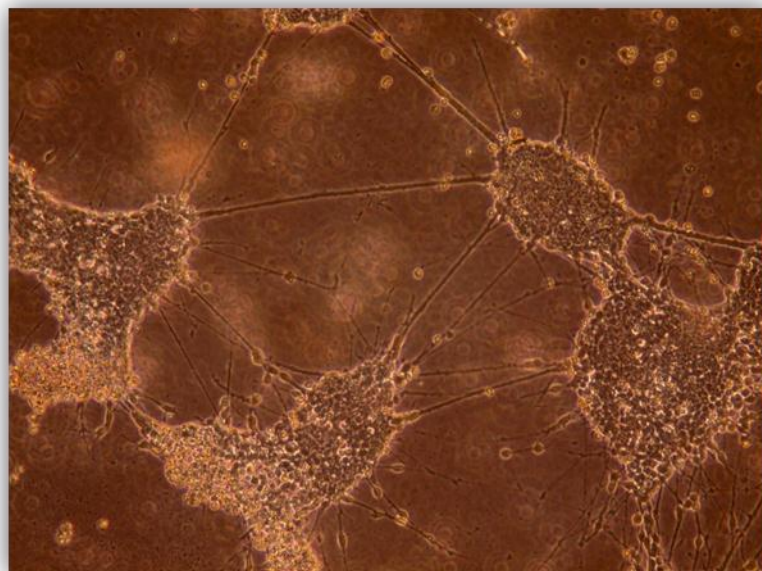
3.1.2 Neurodiferenciaci

Jedním z aktuálních témat v medicíně je léčba neurodegenerativních onemocnění. Ztráta neuronů vede obvykle k funkčnímu deficitu a regenerace v centrálním nervovém systému (CNS) je omezená, ne však zcela nemožná. Léčba onemocnění CNS je sice problematická, ale nadějnou metodou vedoucí k náhradě postižených či zaniklých buněk a povzbuzení vnitřních regeneračních mechanismů v postižené tkáni by mohlo být právě využití kmenových buněk.

Neurodiferenciaci myších kmenových buněk je provedena za pomoci roztoku retinové kyseliny (RA, $c = 5 \times 10^{-7}$ M) a výměny média kultivačního za diferenciaci - bezsérové (SF), jedná se o médium DMEM/F12 (1:1), které je doplněno o 0,1 mg/ml L – glutaminu, 0,1 mg/ml selenu, insulinu a transferinu, 100 i.u./ml penicilinu a 0,1 mg/ml streptomycinu. Buňky jsou kultivovány v diferenciaci médiu s kyselinou retinovou po dva dny, od třetího den již přidáme pouze samotné diferenciaci médium - DMEM/F12. Přibližně po jednom týdnu můžeme pozorovat vznikající neuronální fenotyp buněk, jak je viditelné z obrázků 23 a 24.



Obrázek 23: A,B - Nediferencované kmenové buňky linie P19, zvětšeno 20x; C, D – Diferencované kmenové buňky za pomoci kyseliny retinové – viditelný neuronální fenotyp buněk, zvětšeno 20x a 40x



Obrázek 24: Neuronální fenotyp diferencovaných embryonálních nádorových kmenových buněk, zvětšeno 40x

3.2 Kardiodiferenciace

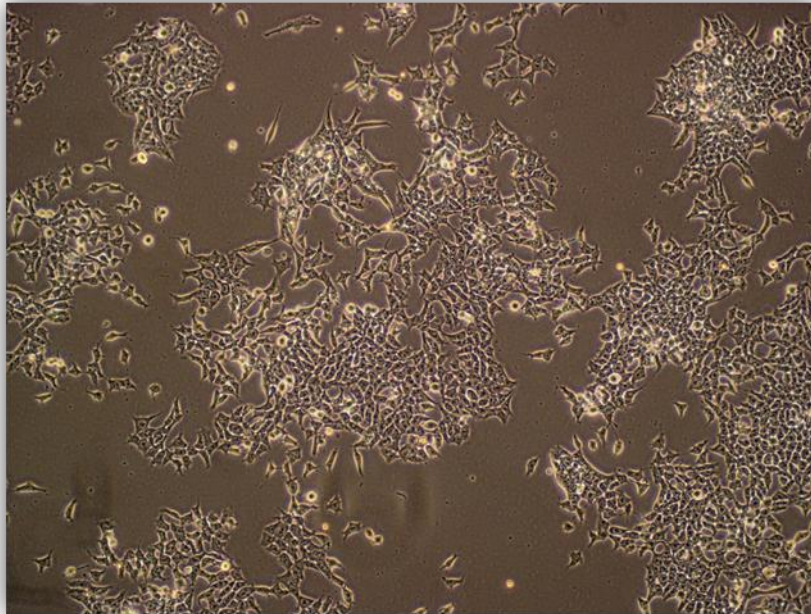
Onemocnění kardiovaskulárního systému, zvláště pak infarkt myokardu, vévodí tabulkám morbidity a mortality v průmyslově vyspělých zemích. Infarkt myokardu může vést ke ztrátě kardiomyocytů a náhradě kontraktilní tkáně fibroblasty, čímž dochází k formování méněcenné vazivové jizvy, která postrádá kontraktilní vlastnosti a vede k regionální dysfunkci srdeční tkáně.

Jednou z možností léčby srdečních onemocnění v jejich konečné fázi je transplantace srdce. Tu ale doprovází imunologické obtíže, nežádoucí účinky imunosupresivní léčby, pooperační komplikace a mnoho dalších limitujících faktorů. Jako alternativa orgánové transplantace připadá v úvahu transplantace buněčná, jejímž důsledkem by měla být jak reparace poškozených kardiomyocytů, a tedy podpora srdečních funkcí, tak také podpora tvorby cév (diferenciací podaných endotelových progenitorů). Při *in vitro* pokusech jsou jako jedna z možných variant studovány i embryonální kmenové buňky.

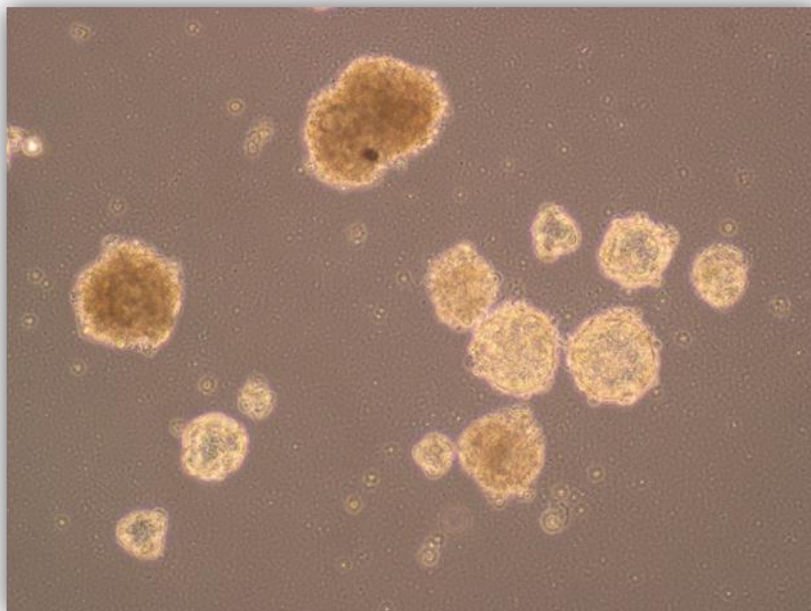
Nediferencované myší embryonální kmenové buňky linie R1 byly kultivovány na tkáňových kultivačních miskách potažených 0,1% vodným roztokem želatiny v Dulbecco's modified Eagle's médiu (DMEM). Toto médium bylo obohaceno o 20 % fetálního telecího séra, 0,1 mg/ml L – glutaminu, 0,05 mM β -mercaptoethanolu, 100 i.u./ml penicilinu, 0,1 mg/ml streptomycinu a 1000 u/ml leukemického inhibičního faktoru (LIF), který zajišťuje udržení pluripotence.

Pro získání embryoidních tělísek (EB) byly buňky přeneseny do neadhezivních bakteriologických misek a jejich předchozí médium bylo vyměněno za jiné, které bylo svým složením shodné s předchozím, vyjma přítomnosti LIF. Poté došlo k formování embryoidních tělísek a k aktivaci diferenciačních pochodů (kultivované buňky a vzniklá EB jsou vidět na obrázku 25, 26 a 27). Buňky byly takto kultivovány po 6 dní. Vzniklá EB byla následně přenesena zpět na kultivační misky potažené prasečí želatinou a kultivována ve stejném médiu, tj. v médiu bez LIF. Po 24 hodinách bylo médium odsáto a nahrazeno médiem bezsérovým (SF), jedná se o médium DMEM/F12 (1:1), které je doplněno o 0,1 mg/ml L – glutaminu, 0,1 mg/ml L selenu, insulinu a transferinu, 100 i.u./ml penicilinu a 0,1 mg/ml streptomycinu. V tomto médiu pak dochází ke konečné diferenciaci myších embryonálních kmenových buněk. Po 14-ti dnech bylo možno pozorovat kontraktilní aktivitu vznikajících kardiomyocytů (video kontraktilní aktivity kardiomyocytů je dostupné z webových stránek

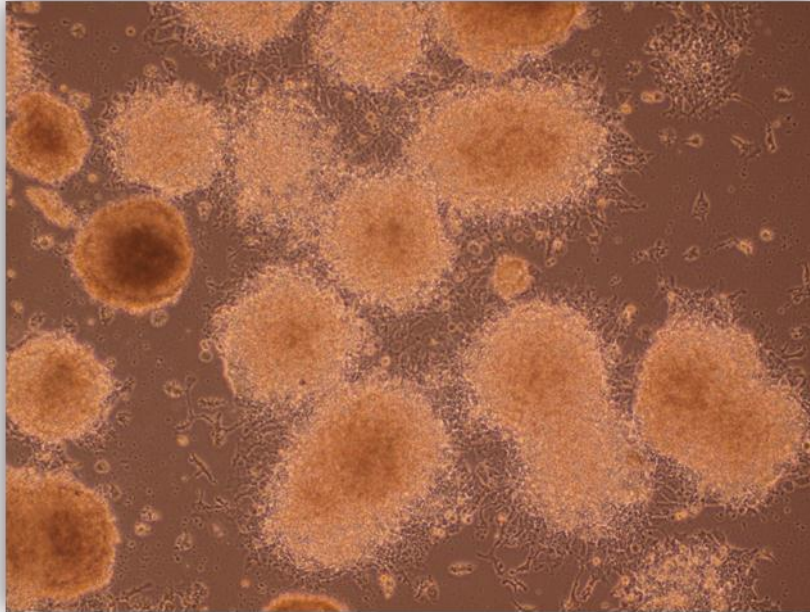
Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni). Imunocytochemický průkaz markeru kardiomyocytů – těžkého řetězce myosinu, je patrný z obrázku 28.



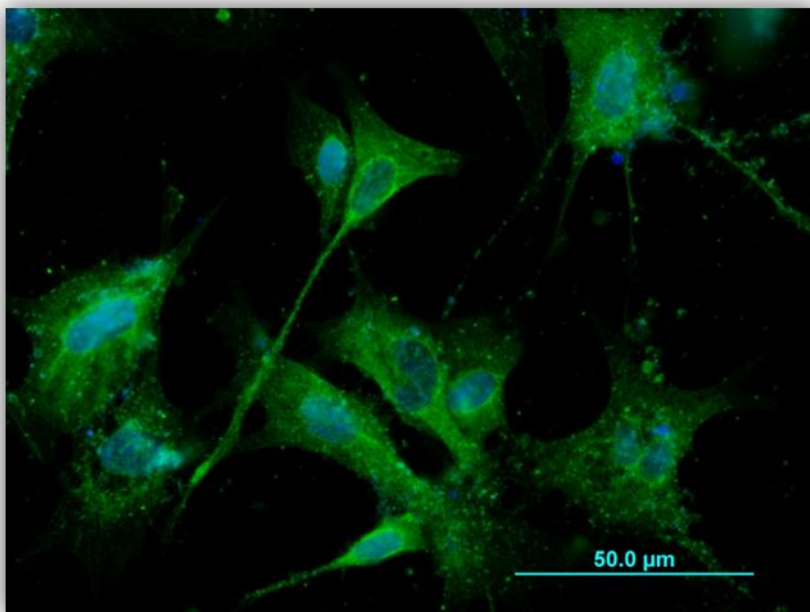
Obrázek 25: Nediferencované adherující myší embryonální kmenové buňky linie R1, zvětšeno 20x



Obrázek 26: Embryoidní tělíska vzniklá shluknutím buněk při nepřítomnosti adhezivního podkladu, zvětšeno 10x



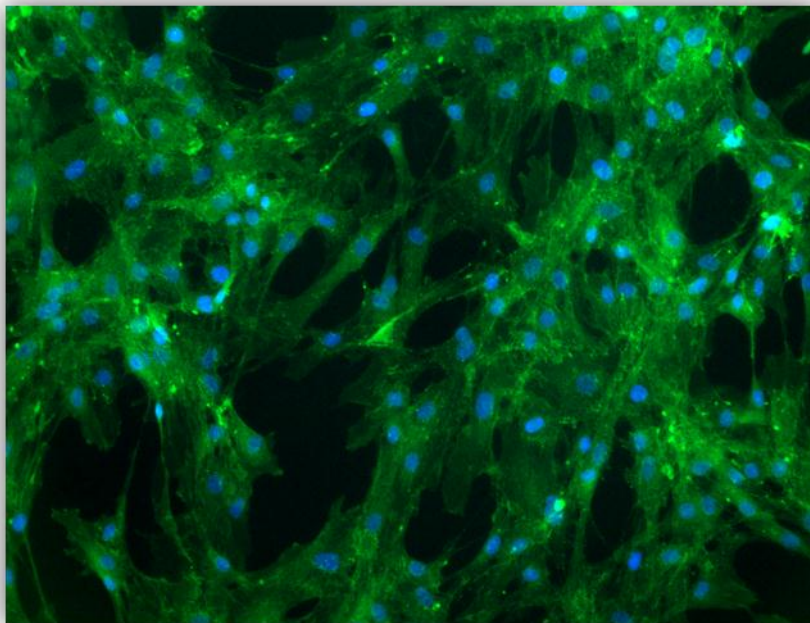
Obrázek 27: Adherující embryoidní tělíska – po jejich přenesení na misku s adherujícím povrchem, zvětšeno 10x



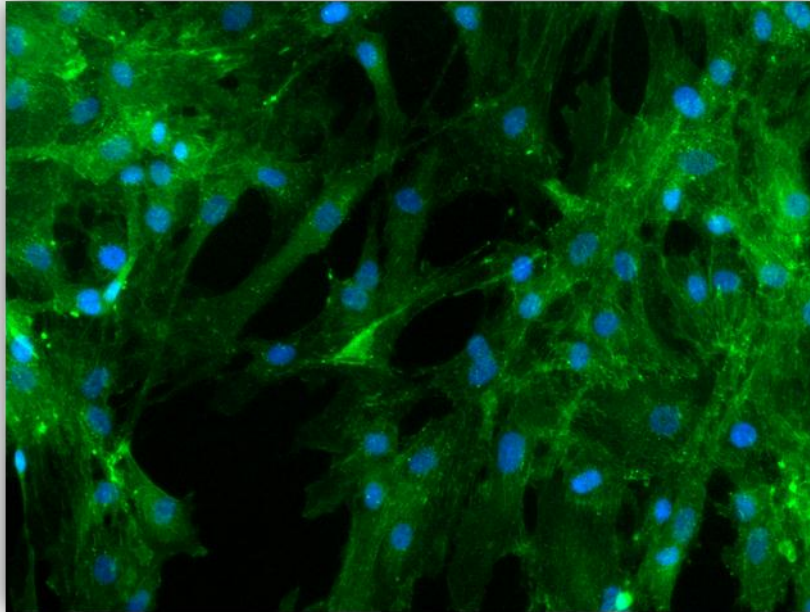
Obrázek 28: Imunocytochemický průkaz přítomnosti těžkých řetězců myosinu (zelená barva) v kardiomyocytech; modře znázorněna jádra

4 Imunocytochemické barvení

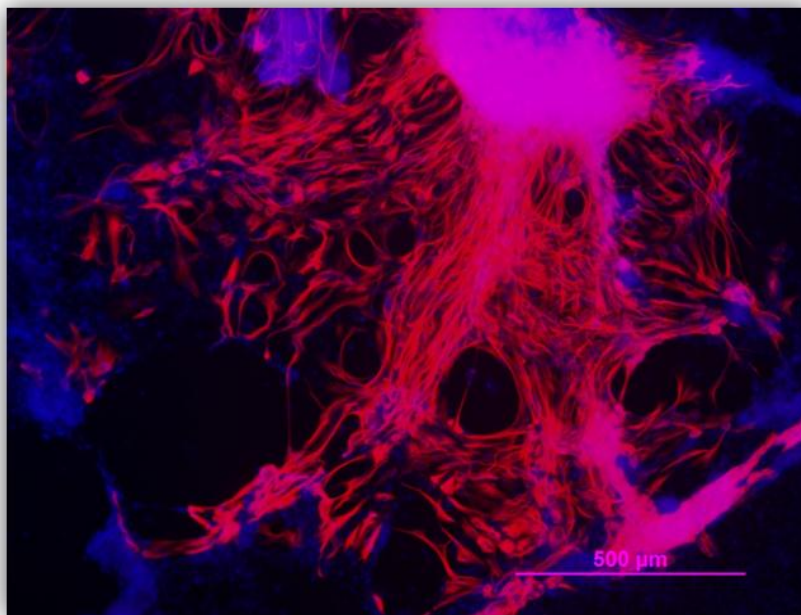
Nejprve jsou buňky fixovány pomocí 4% formaldehydu – 30 minut při teplotě 4°C. Dále permeabilizovány v roztoku 0,2% Triton X 100 + 0,5% Nonidet NP 40 (10 minut) a následně 10 minut v 1% FBS (fetal bovine serum). Buňky jsou s primárními protilátkami inkubovány přes noc při 4°C a poté se sekundární protilátkou po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po přenesení buněk na podložní sklíčka, jsou preparáty zamontovány pomocí montovacího média a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Ukázky imunocytochemického barvení jsou na obrázcích 29 – 34.



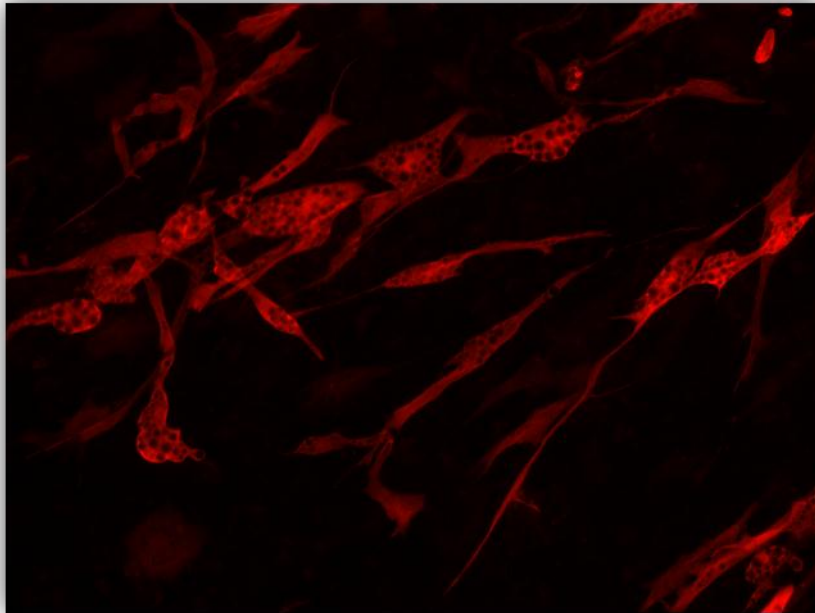
Obrázek 29: Imunocytochemický průkaz beta integrinu (zelená barva) u mesenchymálních kmenových buněk; modře znázorněna jádra, zvětšeno 40x



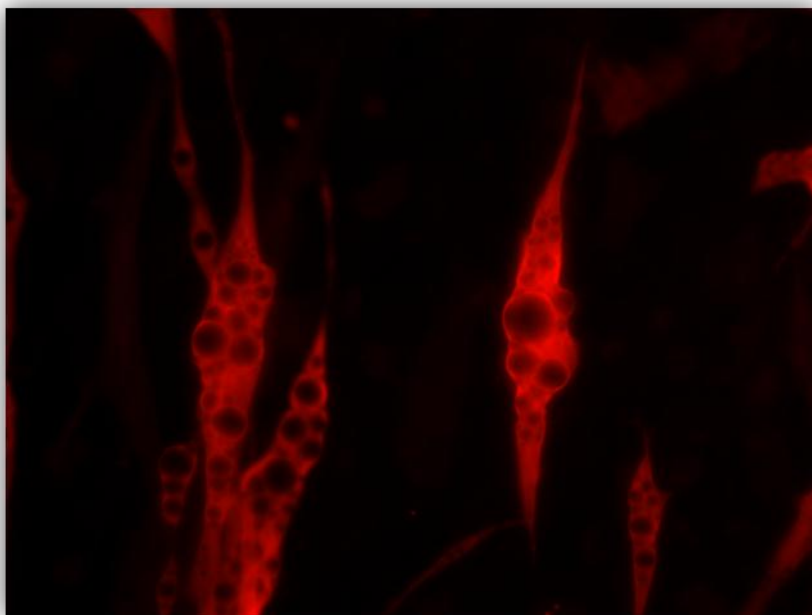
Obrázek 30: Imunocytochemický průkaz beta integrinu (zelená barva) u mesenchymálních kmenových buněk, modře znázorněna jádra, zvětšeno 60x



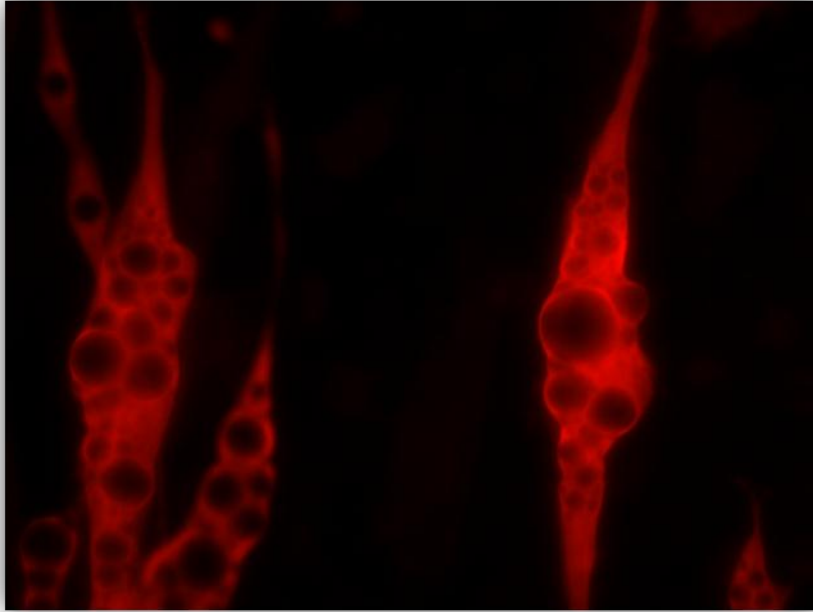
Obrázek 31: Imunocytochemický průkaz GFAP pozitivních buněk (astrocytů, červená barva) u diferencovaných myších embryonálních buněk



Obrázek 32: Průkaz vydiferencovaných adipocytů pomocí protilátky anti –FABP-4 (červená barva), zvětšeno 15x

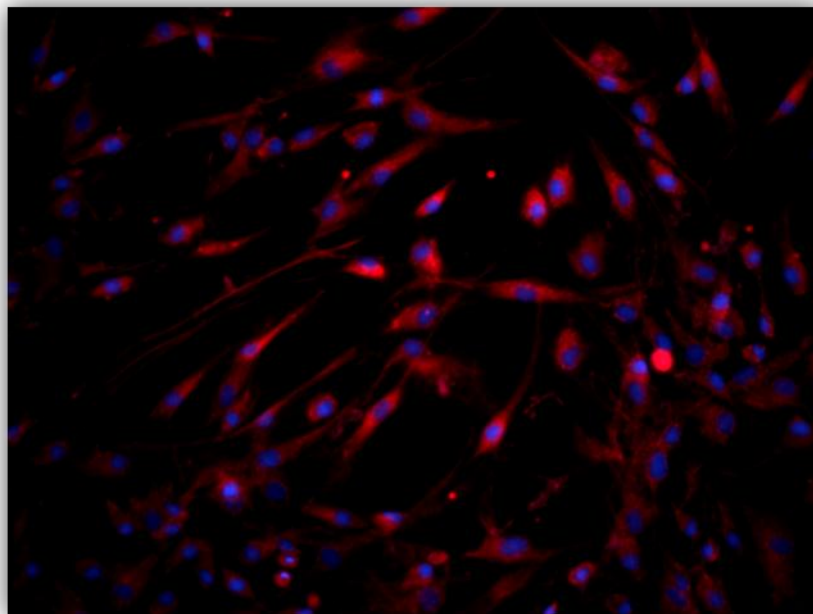


Obrázek 33: Průkaz vydiferencovaných adipocytů pomocí protilátky anti –FABP-4 (červená barva), zvětšeno 40x

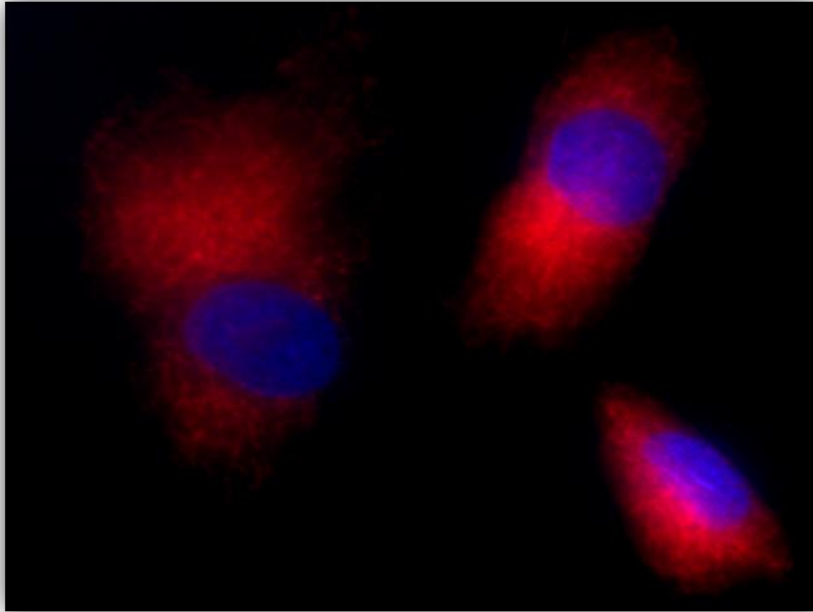


Obrázek 34: Průkaz vydifferentovaných adipocytů pomocí protilátky anti –FABP-4 (červená barva), zvětšeno 60x

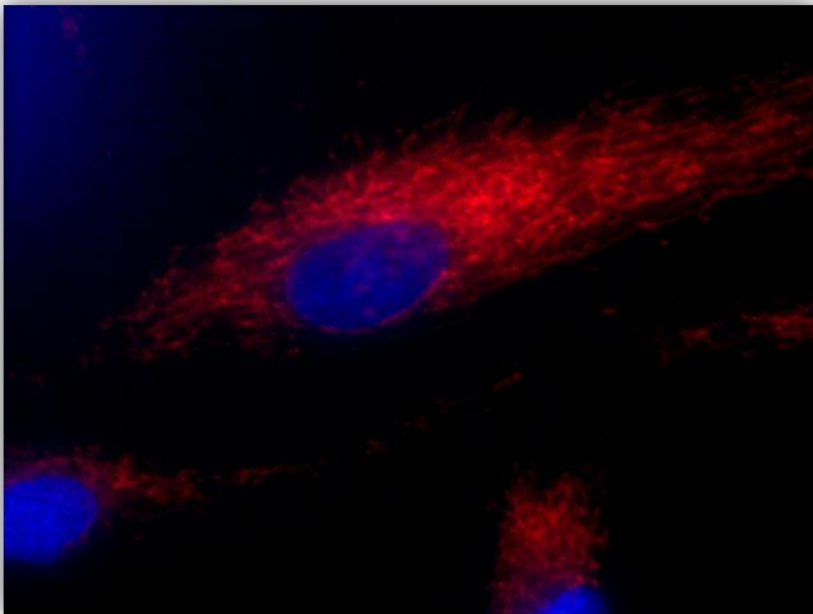
Tímto postupem však dochází k usmrcení buněk. Pokud chceme sledovat některé buněčné struktury „na živo“, používá se metoda tzv. live cell imaging, kdy pomocí speciálních trackerů můžeme dočasně fluorescenčně obarvit nejen celou buňku, ale i např. mitochondrie, lyzosomy, endoplazmatické retikulum, jádro apod. Ukázky nabarvení jádra a mitochondrií v mesenchymálních kmenových buňkách jsou na obrázku 35, 36 a 37.



Obrázek 35: Mesenchymální kmenové buňky s nabarvenými jádry (modrá barva) a mitochondriemi (červená barva), zvětšeno 10x



Obrázek 36: Mesenchymální kmenové buňky s nabarvenými jádry (modrá barva) a mitochondriemi (červená barva), zvětšeno 60x



Obrázek 37: Mesenchymální kmenové buňky s nabarvenými jádry (modrá barva) a mitochondriemi (červená barva), zvětšeno 60x

5 Zdrojová literatura

1. Antonucci I, Pantalone A, Tete S, Salini V, Borlongan CV, Hess D, Stuppia L. Amniotic fluid stem cells: a promising therapeutic resource for cell-based regenerative therapy. *Curr Pharm Des.* 2012;18(13):1846-63.
2. Baccelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol.* 2012 Aug 6;198(3):281-93.
3. Bapat SA. Human ovarian cancer stem cells. *Reproduction.* 2010 Jul;140(1):33-41.
4. Bhattacharyya S, Khanduja KL. New hope in the horizon: cancer stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2010 Apr;42(4):237-42.
5. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11):2739-49.
6. Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett AJ. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2000 Sep 14;343(11):750-8.
7. Cutler C, Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem Cells.* 2001;19(2):108-17.
8. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G Jr, Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol.* 2006;419:426-38.
9. Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000 Nov 6;192(9):1281-8.
10. Filip S, Mokřý J, Hruška I. *KMENOVÉ BUŇKY: Biologie, medicína, filozofie.* Praha: Galén, 2006, první vydání, 223 stran. ISBN 80-7262-401-6.
11. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med.* 2000 Feb;6(2):88-95.
12. Joo S, Ko IK, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research. *Arch Pharm Res.* 2012 Feb;35(2):271-80.

13. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA.
Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue re generation. *Cytotherapy*. 2009;11(4):377-91.
14. Larijani B, Esfahani EN, Amini P, Nikbin B, Alimoghaddam K, Amiri S, Malekzadeh R, Yazdi NM, Ghodsi M, Dowlati Y, Sahraian MA, Ghavamzadeh A.
Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Med Iran*. 2012;50(2):79-96.
15. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007 Nov;262(5):509-25.
16. Mandel Y, Weissman A, Schick R, Barad L, Novak A, Meiry G, Goldberg S, Lorber A, Rosen MR, Itskovitz-Eldor J, Binah O. Human embryonic and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit beat rate variability and power-law behavior. *Circulation*. 2012 Feb 21;125(7):883-93.
17. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006 Mar 31;311(5769):1880-5.
18. Pachernik J, Bryja V, Esner M, Kubala L, Dvorak P, Hampl A. Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma cells by retinoic acid: inhibitory effect of serum. *Physiol Res* 2005;54:115–22.
19. Pera MF. Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature*. 2011 Mar 3;471(7336):46-7.
20. Sato K, Ozaki K, Mori M, Muroi K, Ozawa K. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease: basic aspects and clinical outcomes. *J Clin Exp Hematop*. 2010;50(2):79-89.
21. Shi M, Liu ZW, Wang FS.
Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2011 Apr;164(1):1-8.
22. <http://stemcells.nih.gov/>
23. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
24. Wright DE, Cheshier SH, Wagers AJ, Randall TD, Christensen JL, Weissman IL.
Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor causes selective mobilization of bonemarrow hematopoietic stem cells into the blood after M phase of the cell cycle. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2278-85.

25. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 2012 May 25;17(6):6196-236.