

# ALTERNATIVE CULTURE METHODS AND LABELLING OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS

## ALTERNATIVNÍ ZPŮSOBY KULTIVACE A ZNAČENÍ MYŠÍCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

**Kroupová J.** <sup>1,3</sup>, **Horák D.** <sup>2,4</sup>, **Pacherník J.** <sup>1,4</sup>, **Bryja V.** <sup>3,4</sup>, **Hampl A.** <sup>1,3,4</sup>,  
**Dvořák P.** <sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoř molekulární embryologie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,

<sup>2</sup>Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha,

<sup>3</sup>Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha,

<sup>4</sup>Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, Karlova Univerzita, Praha, Česká republika.

E-mail: muf@mendelu.cz

### ABSTRACT

In connection with the possibility of using embryonic stem (ES) cells in cell replacement therapy, we labelled of model mouse ES cells by superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles. We analysed the amount of iron per cell, percentage of labelled cells, the apoptosis and undifferentiated state of ES cells. Our data show that ES cells labelled with iron oxide nanoparticles retain all basic properties of ES cells. Furthermore, we cultivated ES cell on three-dimensional porous scaffolds, poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based (PHEMA) hydrogels, with different properties, (e.g. origin and size of pores, biodegradability and surface treatment with gelatine). We determined the ability of ES cells to adhere and proliferate on surface and inside of pores of these polymers. Our data show that the grow of ES cells is best supported by hydrogels with low amount of crosslinking agent and crystalline porogen in a polymerization mixture.

**Keywords:** embryonic stem cells, cell therapy, SPIO nanoparticles, hydrogels

### ABSTRAKT

V souvislosti s možným použitím embryonálních kmenových (Embryonic Stem, ES) buněk v transplantační buněčné terapii jsme značili modelové myši ES buňky superparamagnetickými železitými (superparamagnetic iron oxide, SPIO) nanočásticemi a testovali obsah železa na buňku, procento označených buněk, zachování nediferencovaného charakteru a apoptózu. Myši ES buňky označené SPIO nanočásticemi si zachovávají všechny své původní vlastnosti. Dále jsme ES buňky kultivovali na trojrozměrných porézních nosičích, poly(2-hydroxyetylmetakrylátových) (PHEMA) hydrogelech, s různými vlastnostmi, jako je velikost pórů související s jejich původem, biodegradovatelnost nebo povrchové ošetření želatinou.

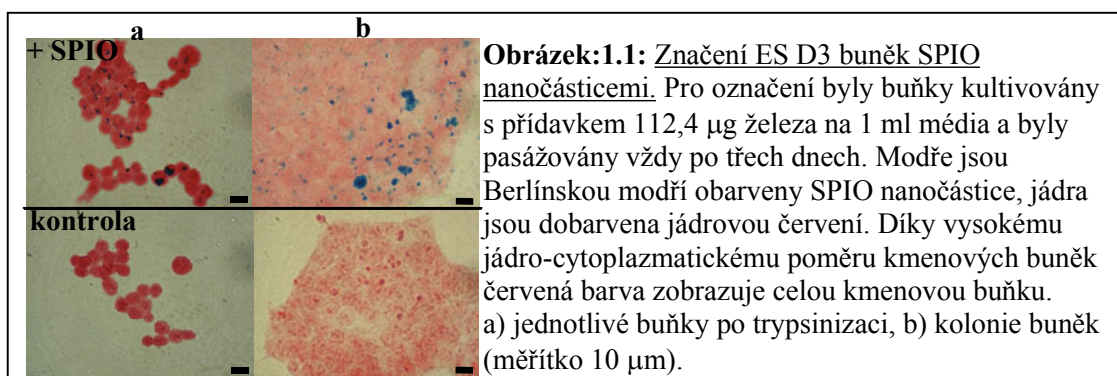
Zjišťovali jsme schopnost ES buněk přichytit se a růst na povrchu i uvnitř pórů těchto nosičů a jejich vhodnost pro použití v buněčné terapii. Naše analýzy ukázaly, že nejvhodnějšími jsou hydrogely s nízkým obsahem síťovadla a krystalickým porogenem v polymerizační směsi.

**Klíčová slova:** embryonální kmenové buňky, buněčná terapie, SPIO nanočástice, hydrogely

Pluripotentní, nediferencované, rychle se dělicí ES buňky s vysokou telomerázovou aktivitou mají původ v primitivním ektodermu preimplantačních blastocyst. Poprvé byly izolovány dvěma na sobě nezávislými týmy z myši (Evans a Kaufman, 1981; Martin, 1981). *In vivo* dávají buňky primitivního ektodermu vzniknout zárodečným buňkám a obalům, ale hlavně buňkám všech třech zárodečných listů – entodermu, mezodermu a ektodermu, které vytvářejí vlastní embryo. ES buňky se *in vitro* kultivují na výživné vrstvě primárních embryonálních fibroblastů (PEF), které produkují do média množství růstových faktorů a především leukemický inhibiční faktor (LIF). LIF je nezbytný pro udržení nediferencovaného charakteru ES buněk. Udržet pluripotentní a nediferencovaný charakter ES buněk lze i bez přítomnosti výživné fibroblastové vrstvy přidáním LIF do kultivačního média ve formě rekombinantního proteinu (Gough a kol., 1989). Odstraněním LIF z média jsou ES buňky *in vitro*, podobně jako *in vivo* během embryonálního vývoje, indukovány k přeměně do mnoha typů buněk a jsou tak výborným modelem pro studium diferenciačních procesů probíhajících během embryonálního vývoje. V roce 1998 byly izolovány i lidské ES buňky (Thomson a kol., 1998) a tímto objevem se ES buňky dostaly do popředí vědeckého zájmu pro jejich vysoký potenciál při léčbě mnohých závažných onemocnění nebo pórůzových stavů (např. Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba, diabetes, neuromotorické poruchy způsobené poškozením míchy, atd.). Existují dvě strategie pro aplikaci buněčné terapie – transplantovat buňky v suspenzi nebo rostoucí na trojrozměrném nosiči. Na modelových myších ES buňkách jsme testovali značení superparamagnetickými železitémi (superparamagnetic iron oxide, SPIO) nanočásticemi, které jsou detekovatelné metodou nukleární magnetické rezonance (NMR). *In vivo* by tak bylo možné zjistit osud, funkční zapojení a chování buněk použitých při transplantační terapii. Je-li nutné v rámci terapie obnovit nejen funkci, ale i strukturu tkáně, je nasnadě využití trojrozměrných porézních nosičů jako opěrné kostry pro růst buněk. Testovali jsme proto porézní poly(2-hydroxyethylmetakrylátové) (PHEMA) hydrogely s různými vlastnostmi.

Pro veškeré popsané analýzy byly používány ES buňky linie D3, které byly kultivovány v kultivačním DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) médiu upraveném pro ES buňky s přidáním 20 % fetálního telecího séra, 2-mercaptoethanolu, neesenciálních aminokyselin, nukleosidů, penicilinu, streptomycinu a rekombinantního myšního LIF při 37°C, v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> a vlhkosti 95 %. Před barvením byly buňky fixovány v 4% paraformaldehydu, pro SDS-

PAGE elektroforézu a analýzu western blot byly buňky lyzovány v SDS lyzačním pufru (1% SDS, 50mM Tris pH 6,8, 10% glycerol). Mikroskopické analýzy byly provedeny na mikroskopu Olympus IX70 s Hoffmanovým modulačním kontrastem v procházejícím světle. Bjorklund a kolektiv v roce 2002 publikovali, že po transplantaci malého množství nediferencovaných myších kmenových buněk do krysího mozku se tyto buňky přeměňují na plně diferencované dopaminergní neurony. V tomto případě se nabízí možnost sledovat buňky po jejich přímé transplantaci do těla příjemce metodou NMR. ES D3 buňky jsme proto značili SPIO nanočásticemi Endorem, které mají průměr 80-150 nm (Wang a kol., 2001). Označení buněk je nezávislé na membránových receptorech a je díky tomu použitelné u všech savčích buněk, tedy i u myších ES buněk (Bulte a kol., 2001). Naším cílem bylo prokázat, že je možné ES buňky označit SPIO nanočásticemi, a že si i nadále uchovávají své původní vlastnosti. Analýzou morfologie a proliferace buněk kultivovaných v přítomnosti SPIO

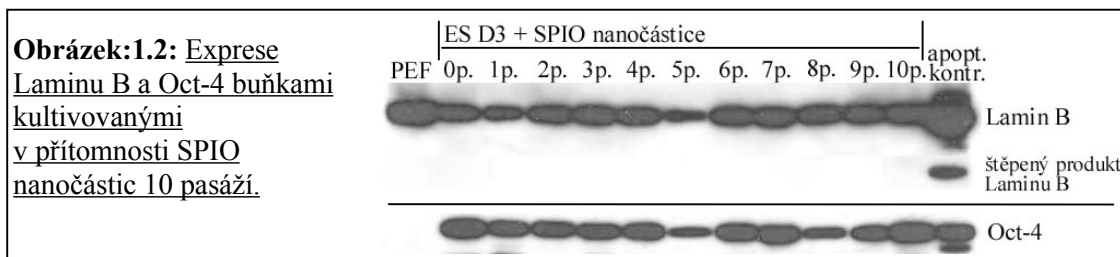


nanočástic se prokázalo, že tyto částice neovlivňují růst ani vzhled buněk (neukázáno). Obsah železa v buňce po třetí pasáži byl mineralizací stanoven na 13,6 pg železa/buňku, což je v rozmezí, které udává literatura jako výhodné pro NMR (Bulte a kol., 2001). Barvení železa Berlínskou modří v jednotlivých buňkách i narostlých koloniích v porovnání s kontrolními prokázalo, že se jedná o specifické značení, v kontrolách se vůbec neobjevuje modré zbarvení (obrázek 1.1). Označených buněk je v první pasáži přibližně 40 a v dalších pasážích se množství označených buněk ustaluje na přibližně na 80-85 procentech (tabulka 1.1).

**Tabulka 1.1: Množství označených buněk SPIO nanočásticemi endorem.** Bylo spočítáno 20 krát 100 buněk, kdy jako pozitivní byla počítána každá buňka obsahující jakékoliv množství SPIO nanočástic.

Číslo pasáže	Označené buňky [%]
1	40,81 $\pm$ 5,90
2	84,27 $\pm$ 7,04
3	80,95 $\pm$ 6,07

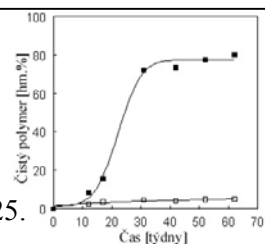
V lyzátech získaných z deseti po sobě jdoucích pasáží buněk kultivovaných s přidavkem SPIO nanočástic byla provedena western blot analýza přítomnosti Laminu B (obrázek 1.2), kdy se v apoptických buňkách kromě neštěpené formy 66 kDa vyskytuje i forma štěpená o velikosti asi 45 kDa, a proteinu Oct-4, který je exprimován buňkami primitivního ektodermu – nediferencovanými ES buňkami. Po imunodetekci je na western blotu zřejmé, že buňky v žádné



z pasáží ve zvýšené míře nepodléhají apoptóze, kromě pozitivní apoptické kontroly, lyzátu z přerostlých odumírajících buněk, se v žádném ze vzorků nevyskytuje štěpený produkt Laminu B. Rovněž přítomnost proteinu Oct-4 v oblasti 45 kDa prokazuje, že všechny vzorky obsahovaly nediferencované buňky. Jako negativní kontrola u tohoto proteinu byly použity diferencované buňky – primární embryonální fibroblasty (PEF), ve kterých Oct-4 detekován nebyl.

U neuromotorických poruch způsobených porušením míchy, kdy je nutné nejen obnovit funkci poškozené tkáně, ale i její strukturu mohou k tomuto účelu sloužit trojrozměrné porézní nosiče vytvářející opěrné „lešení“ pro růst buněk – hydrogely. Ty by měly být neimunogenní, biokompatibilní s růstem živočišných buněk a v ideálním případě degradovatelné. V současné době je známo mnoho typů hydrogelů např. sulfatovaný poly(glukosyloethylmetakrylát) (Taguchi a kol., 1998), N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid (Woerly a kol., 1996), dextranové hydrogely (Cadée a kol., 2000) nebo přírodních polymerů jako kolagen, hyaluronát, fibrin, aj. (Lee a Mooney, 2001). My jsme testovali vlastní porézní poly(2-hydroxyethylmetakrylátové) (PHEMA) hydrogely, které byly polymerizovány v přítomnosti 2 nebo 40 hm.% ne- a degradovatelného síťovadla (etylendimetakrylátu (EDMA) a N,O-dimetakryloylhydroxylaminu (DMHA)), porogenu byla buď směs kapalin cyclohexanol/dodecan-1-ol nebo krystalická látka 30 a 70 hm.% (sacharóza, chlorid sodný). Ověřovali jsme a porovnávali degradovatelnost dvou z připravených vzorků (obrázek 1.3). Během 70 týdnů

**Obrázek 1.3:** Degradace PHEMA  
hydrogelů síťovaných 70 hm.%  
■ degradovatelného DMHA  
□ nedegradovatelného EDMA a  
70 hm.% sacharózy jako porogenu  
po dobu 70 týdnů při 37°C a pH 7,25.



PHEMA kopolymerovaný s DMHA zdegradoval asi z 80 %, zatímco PHEMA-co-EDMA zdegradoval minimálně. Tabulka 1.2 je přehledem všech typů hydrogelů, na kterých byly ES D3 buňky kultivovány, a výsledků analýzy růstu naměřené po čtyřech dnech kultivace pomocí WST-1 testu. Oproti kontrolním buňkám rostoucím na kultivačním plastiku byla porovnána

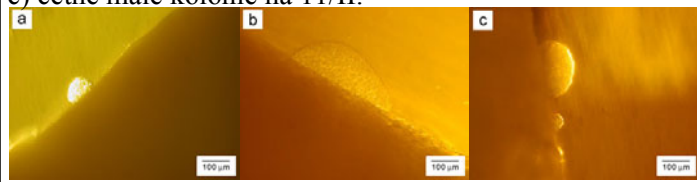
**Tabulka 1.2:** Přehled testovaných hydrogelů, jejich komponent a množství buněk na nich rostoucích. Hodnoty byly získány pomocí WST-1 testu, který využívá přeměny tetrazoniové soli

Porogen	Síťovadlo	Typ hydrogelu	Proliferace buněk [%]
30 % NaCl	EDMA 2% hm.	1/II	35.64 ± 3.06
70 % NaCl	2% hm.	5/II	35.99 ± 7.63
30 % sacharóza	2% hm.	6/II	30.17 ± 4.99
70 % sacharóza	2% hm.	10/II	33.58 ± 6.85
30 % sacharóza	40% hm.	11/II	68.94 ± 11.34
70 % sacharóza	40% hm.	15/II	42.90 ± 6.12
kapalný	DMHA 2% hm.	2/III	13.62 ± 3.34
kapalný	40% hm.	5/III	5.06 ± 1.42
30 % sacharóza	2% hm.	7/III	20.68 ± 8.92
70 % sacharóza	2% hm.	11/III	23.88 ± 4.89
		kontrola	100 ± 6.49

na formazan účinkem sukcinát-tetrazolium-reduktázového systému, který je přítomný v dýchacím řetězci mitochondrií, a je aktivní pouze v živých, proliferujících buňkách.

schopnost buněk přichytit se a růst na povrchu těchto hydrogelů. Nejlépe rostly buňky na hydrogelech polymerizovaných v přítomnosti 40 hm.% nedegradovatelného EDMA, dále na hydrogelech s nízkým obsahem EDMA a DMHA. Jako velice špatná podpora pro růst ES D3 buněk se jeví hydrogely s vysokým obsahem DMHA (5/III). Předpokládáme, že během

**Obrázek 1.4:** Růst kolonií ES D3 buněk na povrchu PHEMA hydrogelů a) velice slabě adherovaná kolonie na 5/III, b) dobře přichycená a rozrostlá kolonie na 11/III, c) četné malé kolonie na 11/II.

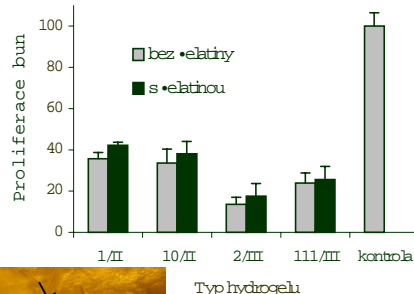
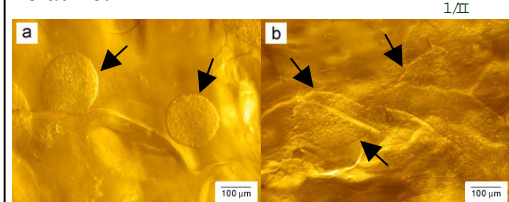


degradace se do média uvolňují pro buňky toxické produkty, pravděpodobně hydroxylamin, a zabraňují tak řádnému přichycení ES buněk k podkladu (obrázek 1.4). 11/II a 15/II jsou přes nejvyšší naměřenou

proliferaci jako trojrozměrná podpora pro buněčný růst nevhodné, díky vysokému obsahu síťovadla mají malé póry a jsou velmi tvrdé. Povrchové ošetření želatinou (obrázek 1.5)

mělo za následek nepatrné zlepšení schopnosti buněk se na tomto podkladu uchytit a proliferovat, tento rozdíl však není statisticky významný. Ošetření kultivačního plastiku želatinou patří mezi běžně používané kultivační

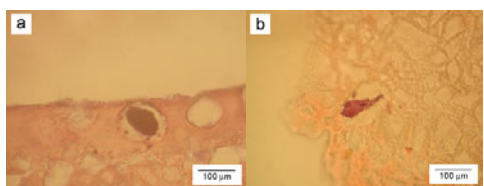
**Obrázek 1.5:** Proliferace ES D3 buněk na hydrogelech a) bez a b) s povrchovým ošetřením želatinou. PHEMA hydrogely byly přes noc inkubovány v 0,1% želatině.



metody, proto byla pro svou dostupnost použita i při našem měření. Na řezech (obrázek 1.6) je

vidět, že buňky rostly v koloniích i uvnitř pórů hydrogelů, pokud byly dostatečně velké. Je to také důkaz toho, že se jedná o navzájem komunikující póry, kterými se buňky mohou dostat dovnitř a při delší kultivaci případně prorůstají celým hydrogelem.

**Obrázek 1.6:** Kolonie ES D3 buněk rostoucích uvnitř pórů PHEMA hydrogelů a) 6/II, b) 11/III. Řezy tlusté 40  $\mu\text{m}$  byly zhotoveny na zmrazovacím mikrotomu a barveny Mayerovým hematoxylinem (jádra) a eosinem (cytoplazma)



Prokázali jsme, že označení myších embryonálních kmenových buněk SPIO nanočásticemi je možné bez zásahu do propustnosti buněčných membrán, např. použitím transfekčních činidel – lipofektamin, poly-L-lysin, polyamin aj. (Frank a kol., 2003). Toto označení je velmi účinné a dostatečné pro detekci metodou NMR, zároveň ES buňky neztrácejí svůj nediferencovaný charakter a ve zvýšené míře nepodléhají apoptóze. Bylo by možné pomocí NMR sledovat osud, chování a funkční zapojení takto označených buněk v cílové tkáni. Nově připravené PHEMA hydrogely kopolymerované s EDMA nebo DMHA lze s úspěchem použít, jako nosiče pro růst ES buněk. Na základě fyzikálních vlastností, jako je velikost a komunikativní spojení pórů, elasticita, schopnost se přizpůsobit okolní tkáni, a analýzy růstu jsou z testované skupiny pro použití v transplantační terapii nejvhodnější hydrogely 5/II, 10/II a 11/III. Jsou biokompatibilní s růstem myších embryonálních kmenových buněk a buňky na nich narostlé by se daly snadno transplantovat do místa poškození.

## POUŽITÁ LITERATURA

- Bjorklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S., Andersson T., Chen I.Y., McNaught K.S., Brownell A.L., Jenkins B.G., Wahlestedt C., Kim K.S., Isacson O. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1244-1249.
- Bulte J.W.M., Douglas T., Witer B., Zhang S.-C., Strable E., Lewis B.K., Zywicke H., Miller B., van Gelderen P., Moskowitz B.M., Duncan I.D. and Frank J.A. (2001) *Nat. Biotechnol.* 19:1141-1147.
- Cadée J.A., van Luyn M.J.A., Brouwer L.A., Plantiga J.A., van Wachem P.B., de Groot C.J., den Otter W., Hennink W.E. (2000) *J. Biomed. Mater. Res.* 50(3):397-404.
- Evans M.J. and Kaufman M.H. (1981) *Nature* 292:154-156.
- Frank J.A., Miller B.R., Arbab A.S., Zywicke H.A., Jordan E.K., Lewis B.K., Bryant L.H. jr., Bulte W.M. (2003) *Radiology* 228:480-487.
- Gough N.M., Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Wilson T.A., Stahl J., Gearing D.P., Nicola N.A. and Metcalf D. (1989) *Reprod. Fertil. Dev.* 1:281-288.
- Lee K.Y and Mooney D.J. (2001) *Chemical Reviews* 101:1869-1879.
- Martin G.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7634-7638.
- Taguchi T., Kishida A., Sakamoto N., Akashi M. (1998) *J. Biomed. Mater. Res.* 41(3):386-91.

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. and Jones J.M. (1998) *Science* 282:1145-1147.

Wang Y.-X.J., Hussain S.M., Krestin G.P. (2001) *Eur. Radiol.* 11:2319-2331.

Woerly S., Plant G.W., Harvey A.R. (1996) *Biomaterials* 17:301-310.

### **PODĚKOVÁNÍ**

Tato práce vznikla za podpory Fondu rozvoje vysokých škol (3FR1224), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM 432100001, LN00A065) a Akademie věd České republiky (AV0Z5039906, AV0Z4050913).