

VLIV MESENCHYMÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK NA *IN VITRO* KULTURU DOSPĚLÝCH PRASEČÍCH KARDIOMYOCYTŮ

M. Miklíková^{1,3}, D. Jarkovská^{2,3}, M. Čedíková^{2,3}, J. Švíglerová^{2,3},
J. Kuncová^{2,3}, L. Nalos^{2,3}, A. Kořínková⁴, V. Liška^{3,5}, D. Lysák³,
M. Králíčková^{1,3}, L. Vištejnová^{1,3}, M. Štengl^{2,3}

¹Ústav histologie a embryologie, ²Ústav fyziologie, ³Biomedicínské centrum LF UK v Plzni,

⁴Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, ⁵Chirurgická klinika FN Plzeň

Kardiální insuficience široké etiologie je jednou z vedoucích příčin úmrtnosti v lidské populaci (1). Po prodělání koronární příhody se často stav pacientů ještě dále zhoršuje, mnoho z nich nakonec dospěje k fatálnímu srdečnímu selhání (2). Díky vývoji v odvětví farmakoterapie, kardiochirurgie a intervenční kardiologie jsou možnosti léčby koronární insuficience široké, přesto se stále objevují nové případy, kdy je postižení srdeční tkáně příliš rozsáhlé a terapie tudíž nedostatečná (3).

Bylo prokázáno, že mesenchymální kmenové buňky (MSC) mají příznivý efekt na hojení srdeční svaloviny (1, 3, 4). Tento efekt může být dvojího charakteru, MSC mohou diferencovat do buněk srdeční svaloviny, kardiomyocytů (CMC), a/nebo podporovat funkci CMC produkcí bohaté směsi regulačních a podpůrných molekul (např. interleukin 10 (IL-10), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), fibroblastový růstový faktor (FGF) a další), a podpořit tak regeneraci srdce jako celku (5–8). I přes značné množství *in vitro* (9–11) a *in vivo* (6, 12, 13) experimentů ukazujících pozitivní vliv MSC na regeneraci srdeční tkáně, jsou výsledky klinických studií, kdy jsou MSC aplikovány pacientům se širokým spektrem kardiálních poškození, stále nejednoznačné (3, 14, 15). Pro úspěšnou transformaci aplikace MSC do běžné klinické praxe je tedy nutné detailněji pochopit působení MSC na CMC a přesněji definovat podmínky případného pozitivního působení MSC.

Cílem této práce bylo připravit *in vitro* kulturu dospělých prasečích CMC a charakterizovat vliv prasečích MSC na přežívání CMC v *in vitro* kultuře. Pro tuto studii byly vybrány prasečí buňky, protože jejich charakteristiky jsou velmi blízké lidským (16). V rámci studie byla provedena série *in vitro* experimentů od izolace a kultivace CMC až po jejich morfologické pozorování a kokultivační studie s MSC.

MATERIÁL A METODY

Veškeré zacházení s experimentálními zvířaty probíhalo v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely. Všechny experimenty byly schváleny Odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty Lékařské fakulty v Plzni.

Izolace a kultivace mesenchymálních kmenových buněk

Pro experimenty byly využity mesenchymální kmenové buňky (MSC) izolované z kostní dřevě dospělých prasat (*Sus Scrofa*, n = 5).

Kostní dřevě byla získána aspirací z *tuberositas tibiae* prasat v celkové anestezii. Aspirát byl zředěn přidáním fosfátového pufru (PBS) v poměru 1 : 1 a opatrně navrstven na Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Velká Británie) v poměru 6 : 4. Po centrifugaci (435× g, 30 min) následoval odběr opalescentní vrstvy mononukleárních buněk do čisté 15 ml zkumavky (Techno Plastic Products, TPP, Švýcarsko). Buňky byly promyty PBS a centrifugovány (1000× g, 8 min). Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v kompletním MSC médiu, jež se skládalo z α -modified Eagle's media (GE Healthcare, Velká Británie) obohaceného o 10% fetální bovinní sérum (FBS) (Biosera, Francie), penicilin (100 IU/ml) a streptomycin (100 µg/ml) (Biosera, Francie). Buněčná suspenze byla nasazena na kultivační plast (TPP, Švýcarsko) a kultivována v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO₂). Po 48 hod byly odmyty volně plovoucí buňky a přisedlé MSC zůstaly v kultuře. Výměna média probíhala každé 2–3 dny.

Analýza fenotypu mesenchymálních kmenových buněk

Pro ověření, zda se jedná o MSC, byla hodnocena morfologie buněk pod světelným mikroskopem, byl proveden test diferenciaci, kde bylo sledováno, zda se buňky dokážou diferencovat do tří základních linií (adipocytární, chondrocytární a osteocytární) a průtokovým cytometrem byla ověřena exprese znaků typických pro MSC (CD44^{pos}, CD73^{pos}, CD90^{pos}, CD45^{neg}).

Světelná mikroskopie

Pomocí světelného mikroskopu (Nikon Eclipse Ti, Japonsko) byly identifikovány MSC jako přisedlé buňky s protaženým tělem, obsahujícím velké kulaté jádro, a s několika výběžky.

Test diferenciaci MSC

Po oplachu neadherentních buněk (48 h po izolaci) byla část MSC pasážována užitím trypsinu, TrypLE™ Select (Gibco, Life Technologies, Dánsko) a nasazena na 3 jamky 6jamkové destičky (TPP, Švýcarsko), kdy do každé jamky bylo přidáno jiné diferenciacní médium. Pro diferenciaci do osteocytární linie bylo k MSC přidáno komerčně dostupné médium StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, USA), pro diferenciaci do chondrocytární linie médium StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, USA) a pro diferenciaci do adipocytární linie médium StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, USA). Výměna médií probíhala každé 3 dny. Po 14 dnech kultivace v adipo- a chondrodiferenciacním médiu, respektive 21 dnech v osteodiferenciacním médiu byly buňky opláchnuty PBS a obarveny. Adipocytární diferenciaci byla potvrzena barvením Oil Red O (Sigma-Aldrich, USA), které červeně barví tukové částice uvnitř buněk. Chondrocytární diferenciaci byla potvrzena barvením Alcianovou modří (Sigma-Aldrich, USA), která barví modře mukopolysacharidy přítomné v chrupavkách. A konečně, osteocytární diferenciaci byla potvrzena barvením Alizarin

Red S (Sigma-Aldrich, USA), které červeně barví kalceinové molekuly produkované diferencovanými buňkami.

Ověření markerů MSC průtokovou cytometrií

Část MSC (100 000 buněk) sklizená s využitím TrypLE™ Select (Gibco, Life Technologies, Dánsko) byla použita k fenotypické charakterizaci MSC v průtokovém cytometru. Buňky byly promyty PBS, resuspendovány ve 100 μ l PBS a smíchány se 3 μ l protilátek; anti-CD44 DAPI (Biolegend, USA), anti-CD45 FITC (Bio-Rad, USA), anti-CD73 PE-A (RnD Systems, Kanada) a anti-CD90 APC (Biolegend, USA) a inkubovány 15 min ve tmě při pokojové teplotě. Následně byla suspenze promyta PBS a buňky byly resuspendovány v 300 μ l PBS. Cytometrická analýza byla provedena přístrojem BD FACS Aria Fusion (Becton Dickinson, USA) a výsledky vyhodnoceny BD FACS Diva 8.0.1 softwarem. Jako MSC byly hodnoceny všechny buňky pozitivní na markery CD44, CD73 a CD90, které byly zároveň negativní pro CD45.

Izolace a kultivace kardiomyocytů

Kardiomyocyty (CMC) byly izolovány z levých komor mladých dospělých prasat (*Sus Scrofa*). Ze zvířete ($n = 5$) v celkové anestezii bylo vyňato srdce, které bylo ihned ponořeno do ledově chladného Tyrodova roztoku bez přídavku vápníkových iontů (složení v mmol/l: NaCl 137; KCl 4,5; MgCl₂ 1; CaCl₂ 2; glukóza 10; HEPES 5; pH bylo pomocí NaOH upraveno na hodnotu 7,4; vše Sigma Aldrich, USA). Po kanylaci přední sestupné větve levé věnčité tepny bylo srdce zavěšeno na Langerdorffův aparát a promýváno teplými (37 °C) okysličenými roztoky. Nejdříve Tyrodovým roztokem bez vápníku (5 min), poté Tyrodovým roztokem s vápníkem (0,5 μ M), kolagenázou (1 mg/ml; Roche Diagnostics, Německo) a hovězím sérovým albuminem (BSA, 0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA) po dalších 30 min. Na závěr bylo srdce promyto Tyrodovým roztokem bez vápníku (5 min). Po odstranění endokardu byly CMC získány z rozvolněné stěny levé komory, umístěny do Tyrodova roztoku (37 °C) bez vápníku a opatrně přefiltrovány přes gázu. Koncentrace vápníku byla postupně navyšována v několika krocích (1; 5; 10; 100; 200 μ mol/l) vždy po 10 minutách až na výsledných 0,2 mM Ca²⁺.

Po izolaci byly CMC resuspendovány v kompletním CMC médiu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, USA) obohaceném o 10 % FBS (Biosera, Francie), 4500 mg/l glukózy (Sigma-Aldrich, USA), 4 mmol/l L-glutaminu (Biosera, Francie) a 100 IU/ml penicilinu a 100 μ g/ml streptomycinu (Biosera, Francie). Vzniklá suspenze buněk pak byla použita pro následující experimenty.

Zhodnocení výnosu izolace

Po každé izolaci byl zkušeným pozorovatelem, s využitím světelné mikroskopie, zhodnocen procentuální poměr živých CMC ku mrtvým buňkám v buněčné suspenzi. Za živé CMC byly považovány všechny buňky s protáhlým tvarem, ostře ohraničenými konci a příčným pruhováním.

Zvýšení podílu živých kardiomyocytů v kultuře

Kultivační plast

Pro efektivní oddělení živých CMC od dalších buněk suspenze a optimalizaci kultivačních podmínek byly testovány čtyři rozdílné kultivační povrchy; 1. běžný kultivační plast bez speciální povrchové úpravy (TPP, Švýcarsko), 2. běžný kultivační plast (TPP, Švýcarsko) potažený myším lamininem o koncentraci 1,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA), 3. běžný kultivační plast (TPP, Švýcarsko) potažený 0,5% želatinou (Sigma-Aldrich, ČR), 4. kultivační plast speciálně vytvořený pro zvýšení přilnavosti buněk (Corning, Sigma-Aldrich, USA).

Suspenze buněk byla resuspendována v kompletním CMC médiu, rozdělena do 4 skupin, nasazena na výše zmíněný kultivační plast, a kultivována v inkubátoru za standardních podmínek (37 °C, 5 % CO₂).

Hodnocení přilnavosti buněk ve zmíněných kultivačních podmínkách proběhlo na celkem deseti vzorcích z každé skupiny, 2 opakování pro každé zvíře. Hodnocení prováděl zkušený pozorovatel s využitím světelného mikroskopu. Hodnotou z číselné škály 1–5, kdy jednička značila, že většina (>90 %) buněk plavala v médiu bez přichycení k povrchu a pětka značila situaci, kdy většina buněk přisedala k povrchu, byla označena každá jamka ve druhém dni kultivace.

Pro všechny čtyři sledované kultivační povrchy byly výsledky statisticky zpracovány a vyhodnoceny, běžný kultivační plast bez potahu sloužil jako referenční hodnota.

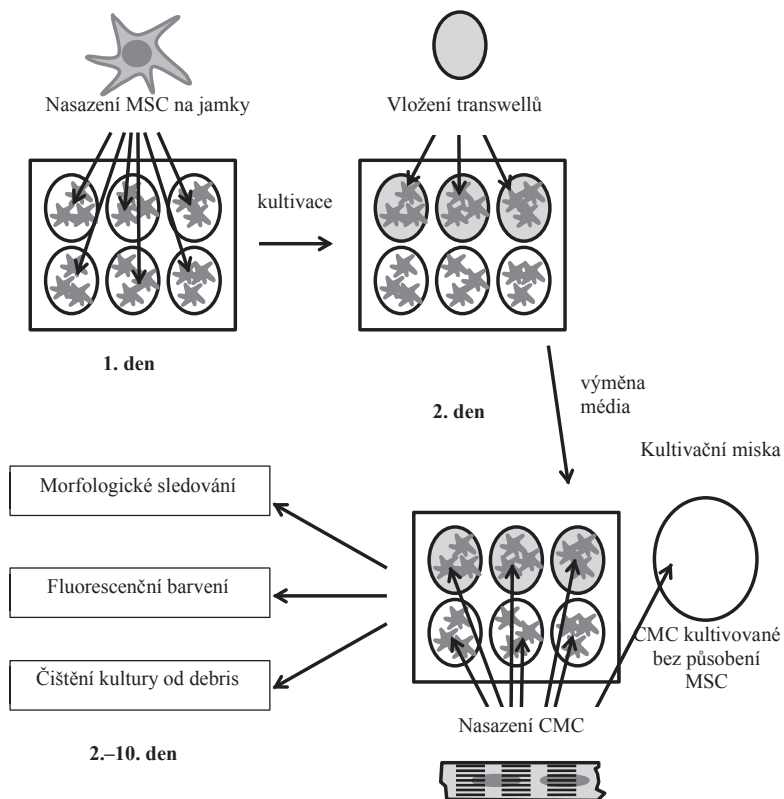
Magnetická separace

Pro získání většího podílu živých CMC v buněčné suspenzi byla testována metoda magnetické separace pomocí manuálního magnetického buněčného separátoru MACS™ (Miltenyi Biotec, Německo) s využitím Dead Cell Removal Kitu (Miltenyi Biotec, Německo), který obsahoval magnetické mikrokuličky schopné se navázat na mrtvé a umírající buňky a pufr usnadňující tento proces. Suspenze buněk byla centrifugována (300× g, 10 min), supernatant odstraněn a buněčná peleta resuspendována v pufru s magnetickými mikrokuličkami z kitu. Po 15 min inkubace byla celá suspenze přenesena do kolonek separátoru. Při průtoku suspenze kolonkou došlo k zachycení mrtvých buněk s navázanými magnetickými mikrokuličkami a do zkumavky pod kolonkou byly sbírány pouze buňky bez navázaných kuliček, tedy živé CMC.

Před magnetickou separací i po ní bylo zkušeným pozorovatelem s využitím světelného mikroskopu zhodnoceno procentuální zastoupení živých CMC v buněčné suspenzi. Výsledky byly srovnány.

Fluorescenční barvení

Pro znázornění mitochondriální sítě byla použita látka MitoTracker® (579/599) (Molecular probes, Life Technologies, USA), která se po přidání do buněčné kultury a 30 min inkubaci dočasně navázala na živé mitochondrie buněk. Jádra byla nabarvena látkou NucBlue® (360/460) (Molecular probes, Life Technologies, USA).



Obr. 1 Postup kokultivačního experimentu. V prvním dnu byly na kulturační plast nasazeny MSC. Další den byly do poloviny jamek vloženy transwell. Čerstvé CMC pak byly rozděleny do tří skupin, část byla nasazena přímo k MSC, část k MSC přes transwelly a část byla nasazena na kulturační misky, pro kultivaci bez působení MSC

Kokultivační experimenty

MSC byly nasazeny na 6jamkovou destičku (TPP, Švýcarsko) v nasazovací hustotě 54 000 buněk/jamka v kompletním MSC médiu a kultivovány do druhého dne. Po odsátí média byl do poloviny jamek vložen transwell, košíček s membránou s 3 μm póry, Transwell® (Corning, Sigma-Aldrich, USA) a do všech jamek bylo dáno kompletní kulturační CMC médium se suspenzí CMC. Jako kontrola byly použity CMC kultivované bez MSC (obr. 1).

Hodnocení přežívání buněk

Každý den až do 10. dne po izolaci byly CMC bez ovlivnění MSC, CMC v přímém kontaktu s MSC a CMC kokultivované s MSC přes transwelly sledovány pod světelným mikroskopem (Nikon Eclipse Ti, Japonsko).

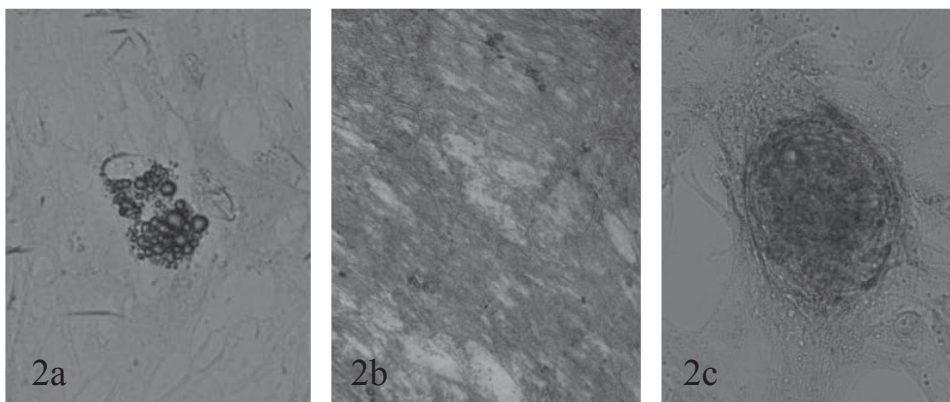
V prvním a třetím dnu bylo prosté pozorování kvantifikováno. Na kultivačním platu ($n = 20$ pro každé zvíře) byly v zorném poli světelného mikroskopu, při zvětšení $10\times$ spočítány živé CMC (protáhlé buňky s příčným pruhováním a lomenými konci) a ostatní buňky. Výsledné procentuální zastoupení živých CMC v suspenzi ve všech opakováních u všech použitých způsobů kokultivace CMC s/bez MSC bylo statisticky vyhodnoceno.

VÝSLEDKY

Izolace, kultivace a fenotyp mesenchymálních kmenových buněk

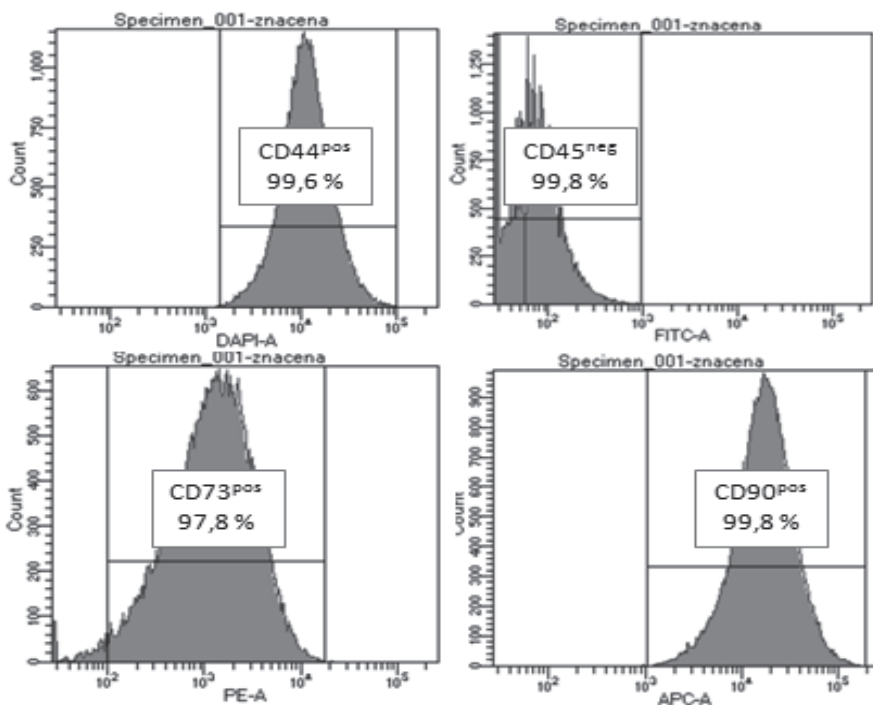
Prasečí MSC lze izolovat dle uvedeného protokolu. Získané MSC vykazovaly charakteristický podlouhlý tvar s několika výběžky a přisedaly ke kultivačnímu platu.

Kultivace MSC s diferenciačními médii potvrdila schopnost buněk diferencovat do tří základních linií. Buňky diferencované do adipocytární linie obarvené Oil Red O vykazovaly červené zbarvení tukových vakuol. Buňky diferencované do chondrocytární linie produkovaly mukopolysacharidy, které se obarvením Alcianovou modří zabarvily modře. Buňky diferencované do osteocytární linie produkovaly kalceinové molekuly, které se po obarvení Alizarin Red S zbarvily do červena (obr. 2).



Obr. 2 Kontrola diferenciačního potenciálu MSC. 2a – MSC diferencované do adipocytární linie. 2b – MSC diferencované do osteocytární linie. 2c – MSC diferencované do chondrocytární linie

Ověření povrchových markerů buněk průtokovým cytometrem prokázalo, že v průměru více jak 98 % buněk v kultuře bylo pozitivní pro markery typické pro MSC (CD44, CD73 a CD90) a zároveň negativní pro marker krevní řady (CD45) (obr. 3).



Obr. 3 Stanovení MSC markerů průtokovou cytometrií. Sledovaná suspenze buněk obsahovala průměrně 98 % MSC, tedy buněk pozitivních na CD44, CD73, CD90 a negativních na CD45

Izolace a kultura kardiomyocytů

Primární prasečí CMC lze izolovat dle uvedeného protokolu. Získané buňky vykazovaly charakteristický fenotyp – protáhlý tvar, ostře lomené konce a příčné pruhování. Problémem byl vysoký podíl okolních mrtvých buněk a buněčné drti, výnos živých CMC byl pouze 20 % (± 10 %).

Zvýšení podílu živých kardiomyocytů v kultuře

CMC pěstované na běžném kultivačním plastu potaženém želatinou a také lamininem prokázaly statisticky významně ($p = 0,00068$ pro želatinu, $p = 0,00011$ pro laminin) vyšší přilnavost ve srovnání s CMC pěstovanými na běžném kultivačním plastu bez potahu či na výrobcem speciálně upraveném plastu pro zvýšenou přilnavost buněk (tab. 1). Společně se zvýšenou přilnavostí CMC bylo pozorováno také zvýšené přisedání dalších buněk suspenze, prostá kultivace na různě upraveném kultivačním plastu tedy nepomohla ke zvýšení podílu živých CMC v kultuře.

Užití magnetické separace CMC z buněčné suspenze pomocí Dead Cell Removal Kitu bylo časově i finančně náročné, avšak umožnilo zvýšit podíl živých CMC v kultuře z iniciačních 20 % (± 10 %) na výsledných 75 % (± 15 %), s malou ztrátou CMC (15 % ± 5 %).

Tab. 1 Srovnání přilnavosti buněk na jednotlivých typech užitého kultivačního plastu s různou povrchovou úpravou. Hodnoceno číselnou škálou zkušným pozorovatelem, škála 1–5, kdy 1 značí většinu plovoucích buněk (>90 %) a 5 většinu přisedlých

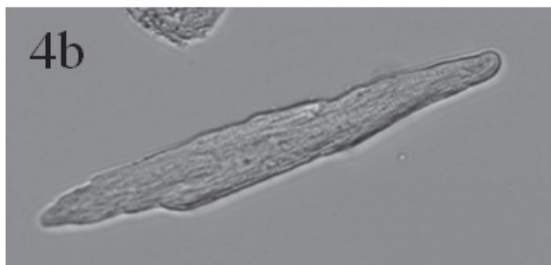
TYP POVRCHU	POTAH	PŘILNAVOST CMC (průměr ± SD)	PŘILNAVOST OKOLÍ (průměr ± SD)
Běžný kultivační plast	–	1,8 ± 0,63	1,8 ± 0,63
Běžný kultivační plast	želatina	3,5 ± 1,08*	3,5 ± 1,08*
Běžný kultivační plast	laminin	3,8 ± 1,03*	3,8 ± 1,03*
Speciálně upravený povrch výrobcem	–	2,2 ± 0,92	2,2 ± 0,92

* Statisticky významný rozdíl (t-test $p < 0,001$) v porovnání s běžným kultivačním plastem bez potahu.

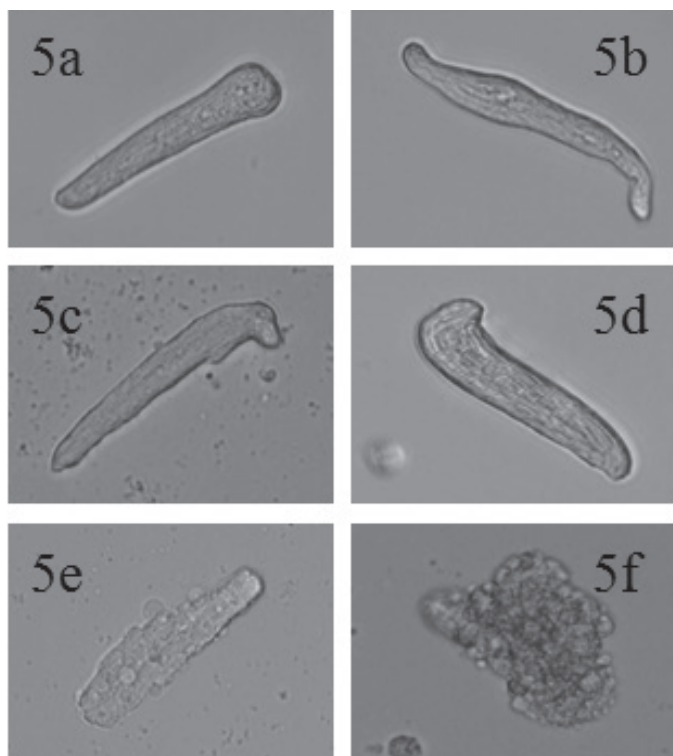
Morfologické změny kardiomyocytů v čase

Čerstvě izolované CMC mají dlouhý trabekulární tvar s jasně ohraničenými lomenými konci, jejich příčné pruhování je jasně viditelné (obr. 4a). V průběhu kultivace se lomené konce pomalu zakulacují a příčné pruhování mizí (obr. 4b). Po 3 dnech kultivace se u CMC začínají projevovat patologie ve fenotypu (obr. 5), ale mnoho buněk si CMC fenotyp stále zachovává. Po 9. dni kultivace již byly morfologicky normální CMC pozorovány jen zřídka.

Užití MitoTrackeru pro fluorescenční mikroskopii ukázalo, že CMC obsahují mitochondrie s dostatečným mitochondriálním membránovým potenciálem pro efektivní oxidaci až do 3. dne po izolaci (obr. 6), v dalších dnech pak byl pozorován prudký propad ve sledovaném fluorescenčním signálu.



Obr. 4 Morfologie normálních kardiomyocytů. 4a – čerstvě izolovaný kardiomyocyt s podélným tvarem, ostrými okraji a jasným příčným pruhováním. 4b – kardiomyocyt po 3 dnech v kultuře, kdy mají buňky stále ještě protáhlý tvar, ale již došlo k zaoblení konců a pomalu se vytrácí příčné pruhování. Zvětšení 40×



Obr. 5 Morfologické deformace CMC. Obrázky ukazují morfologickou deformaci CMC, která začíná po třetím dni kultivace (3–10 den). a–d – deformující se CMC, e – umírající CMC, f – mrtvý CMC. Zvětšení 40×



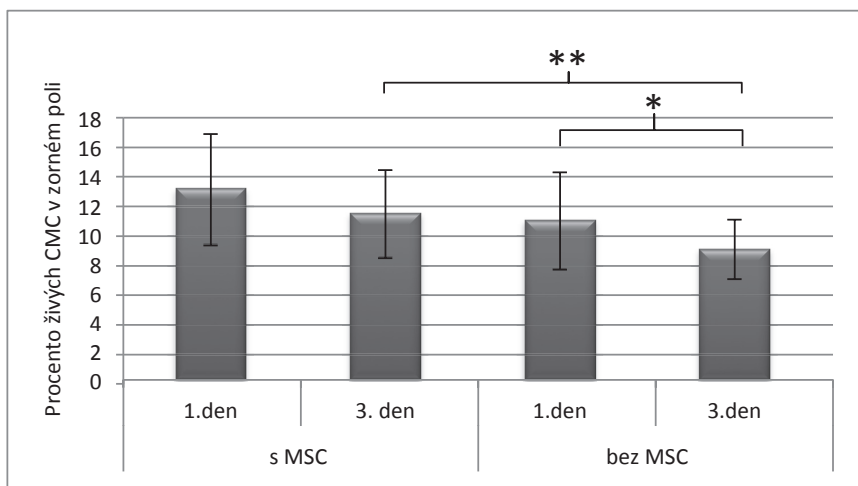
Obr. 6 Fluorescenční barvení mitochondrií CMC ve 3. dni kultivace. Šípka označuje živé CMC. Zvětšení 40×

Kokultivace kardiomyocytů s mesenchymálními kmenovými buňkami

CMC kultivované v přímém kontaktu s MSC ve zvýšené míře přisedaly ke kultivačnímu plastu a také k MSC, kdy společně vytvářely mnohovrstevnou kulturu. Tento způsob kultivace znemožnil hodnocení či použití buněk pro další experimenty, protože nebylo možné buňky od sebe vzájemně oddělit bez jejich poškození. Nicméně, dle pozorování lze říci, že při tomto způsobu kultivace buňky nejdéle přežívají a uchovávají si svůj tvar, pro ztíženou kvantifikaci bylo však toto pozorování nevyhodnotitelné.

CMC kultivované s MSC s využitím transwellů, bez možnosti přímého buněčného kontaktu, si uchovávaly své morfologické vlastnosti přibližně o den déle než CMC kultivované samostatně. Kvantifikace s využitím zkušeného pozorovatele a světelné mikroskopie ukázala nerovnoměrné rozložení dat, proto byla použita neparametrická statistika, Wilcoxonův test. U CMC kultivovaných bez působení MSC byl přítomen významný rozdíl v počtu živých CMC mezi 1. a 3. dnem hodnocení ($p = 0,0196$). MSC kladně ovlivňovaly počet živých CMC ve vzorku, ve srovnání s CMC kultivovanými samostatně, ale v 1. dni nebyl rozdíl statisticky významný. Ve třetím dni kultivace již MSC statisticky významně ($p = 0,0152$) přispívaly k delšímu přežívání CMC, ve srovnání s CMC kultivovanými bez MSC (graf. 1).

Graf. 1 Srovnání procentuálního zastoupení živých CMC v kultuře s/bez MSC. Počet živých CMC v obou kulturách s časem klesá



* Úbytek živých CMC kultivovaných bez působení MSC při srovnání 1. a 3. dne kultivace byl, dle Wilcoxonova testu, statisticky významný ($p = 0,0196$).

** Při srovnání počtu živých CMC v kultuře s/bez MSC byl ve třetím dni, dle Wilcoxonova testu, statisticky významný ($p = 0,0152$).

DISKUZE A ZÁVĚR

Vztahu a vzájemnému působení MSC na CMC se věnuje mnoho autorů (1–10). Většina prací je však provedena na malých zvířecích modelech a při přenosu získaných poznatků na člověka pak dochází k častým diskrepancím (14). Z důvodu co největší podobnosti s člověkem bylo pro naše experimenty zvoleno prase domácí, jehož kardiální charakteristiky jsou lidským velice blízké (16).

Izolace primárních prasečích CMC se ukázala být velmi obtížnou, proces vyžadoval mnoho optimalizačních pokusů, a přesto výsledek nebyl plně uspokojivý. Zaznamenali jsme pouze nízké procento živých CMC v suspenzi buněk ve srovnání s výsledky izolace CMC publikovaných u menších zvířat (17).

Z literatury vyplývá, že MSC jsou schopné přisedat ke kultivačnímu povrchu, čímž po výměně média dojde k vyčištění kultury a zvýšení procentuálního zastoupení CMC v kultuře (18, 19). Vyzkoušeli jsme 4 různé kultivační povrchy, kdy CMC kultivované na běžném kultivačním plastu přisedaly jen minimálně, za to CMC kultivované na upraveném povrchu (laminin, želatina) přisedaly statisticky významně více. Oproti literatuře však v našich experimentech přisedaly také ostatní buňky suspenze (19) a to přímo úměrně CMC, tedy, čím více CMC přilnulo k povrchu, tím více buněk dalších buněk přilnulo také. Tímto způsobem tedy nebylo možné buněčnou kulturu CMC vyčistit.

Metoda magnetické separace zvýšila podíl živých CMC v suspenzi výrazně efektivněji, její širší použití bylo však pro časovou i finanční náročnost opuštěno.

Adultní CMC v kultuře běžně žijí 2–3 dny a poté dochází k dediferenciaci a postupnému zániku buněk (18, 20). Naše experimenty tato zjištění potvrzují, kokultivace s MSC kardiomyocytům svědčí. Kultivace CMC společně s MSC, s umožněním buněčného kontaktu, se zdála být nejvíce efektivní pro přežívání CMC, avšak s buňkami již nebylo možné dále pracovat, protože došlo ke spojení s MSC, a nebylo možné je dále oddělit bez jejich poškození. Přijatelným kompromisem v podpoře přežívání CMC se ukázala kokultivace CMC s MSC prostřednictvím transwellů. Přímý buněčný kontakt byl sice znemožněn, avšak dá se předpokládat parakrinní působení MSC na CMC. Zatímco CMC kultivované bez MSC měly mezi 1. a 3. dnem po izolaci statisticky významný úbytek živých CMC, u CMC kultivovaných s MSC významný rozdíl pozorován nebyl. CMC kokultivované s MSC vykazovaly lepší přežívání než CMC kultivované bez jejich ovlivnění, ve třetím dni byl pak rozdíl statisticky významný.

Závěrem lze říci, že izolace prasečích CMC je komplikovaná avšak reálná. Buněčná suspenze obsahuje mnoho elementů mimo živé CMC, které nelze příliš efektivně odstranit prostou kultivací, lze však využít i jiné metody, jako například magnetickou separaci buněk. Po celou dobu byl u CMC kultivovaných s MSC patrný podpurný trend MSC, ve srovnání s CMC kultivovanými samostatně, ve třetím dni pak již byl rozdíl statisticky významný. Z našich výsledků vyplývá, že MSC podporují přežívání CMC.

SOUHRN

Srdeční nedostatečnost široké etiologie je jednou z vedoucích příčin úmrtnosti lidské populace. Paralelně s konvenční terapií se hledají nové terapeutické možnosti, jako například buněčná terapie s využitím mesenchymálních kmenových buněk (MSC), u kterých se zkoumá vliv na regeneraci srdečního svalu.

V této práci jsme sledovali vliv MSC na kardiomyocyty (CMC) prasat ($n = 5$) v *in vitro* kultuře po dobu 10 dní. CMC byly kultivovány na 4 různých površích (normální kultivační plast, kultivační plast potažený lamininem, kultivační plast potažený želatinou a na speciálním kultivačním plastu upraveném pro zvýšenou přilnavost buněk) za účelem optimalizace kultury a zvýšení podílu živých CMC v kultuře. Zároveň byly CMC kokultivovány s MSC a to jak v přímém kontaktu, tak přes transwelly.

Z výsledků vyplývá, že běžný kultivační plast potažený želatinou nebo lamininem přispívá k přilnavosti buněk významně více ($p < 0,001$), než kultivace na běžném kultivačním plastu bez potahu. Společně se živými CMC však přisedají také další buňky, mrtvé či umírající, tímto způsobem tak nelze kulturu dalších buněk zbavit. Kokultivace CMC s MSC prokázala pozitivní vliv MSC na CMC v *in vitro* kultuře, kdy pozitivní trend byl patrný již první den, ve 3. dni kultivace byl pak rozdíl statisticky významný ($p = 0,0152$).

MSC podporují u CMC delší přežívání v *in vitro* kultuře. Získané poznatky poslouží jako základ pro další studie.

Effect of mesenchymal stem cells on in vitro culture of adult porcine cardiomyocytes

SUMMARY

Cardiac insufficiency of wide etiology is one of the leading causes of mortality of the human kind. In parallel with conventional therapies new therapeutic options are sought, such as cell therapy using mesenchymal stem cells (MSC), where the effect on heart tissue regeneration is examined.

In this work we investigated for 10 days the effect of MSC on cardiomyocytes (CMC) of adult pigs ($n = 5$) in *in vitro* culture. CMC were cultured on four different surfaces (normal cultivation plastic without coating, normal cultivation plastic coated with laminin, normal cultivation plastic coated with gelatin and special cultivation plastic modified to enhance cell adhesion) to optimize the culture and increase percentage of living CMC in cell culture. Simultaneously, CMC were co-cultured with MSC in both direct and also indirect (with use of transwells) contact.

The results show that the normal cultivation plastic coated with gelatin or laminin contributed to the adhesion of cells significantly more ($p < 0.001$) than the cultivation on normal cultivation plastic without the cover. Together with the live CMC adhered also other cells, dead or dying, so simple cultivation is not sufficient to purify the cell culture

from dead and dying cells. Co-cultivation with MSC showed a positive effect on the CMC in *in vitro* culture, the positive trend was visible in the first day of cultivation, but in the third day the difference was statistically significant ($p = 0.0152$).

MSC support longer survival of CMC in *in vitro* culture. The obtained results will serve as a basis for further studies.

PODĚKOVÁNÍ

Tato studie byla podpořena grantem z Grantové agentury UK (číslo 2090214) a Národním programem udržitelnosti Program I (NPU I), číslo LO1503 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, SVV-02680 a SVV-260281.

LITERATURA

1. Silva O. N., de Freitas Souza B. S., Azevedo C. M. et al.: Intramyocardial transplantation of cardiac mesenchymal stem cells reduces myocarditis in a model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 2014: 81. – 2. Sutton M. G. S. J., Shape N.: Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction: Pathophysiol. Therapy. *Circulation.* 101, 2000: 2981–8. – 3. Psaltis P. J., Spoon D. B., Wong D. T. L. et al.: An Update on Stem Cell Therapies for Acute Coronary Syndrome. *Curr. Cardiol. Rep.* 16, 2014. – 4. Narita T., Suzuki K.: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Heart Fail Rev.* 20, 2015: 53–68. – 5. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M. S. et al.: Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ. Res.* 94, 2004: 678–85. – 6. Tang Y. L., Zhao Q., Qin X. et al.: Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann. Thorac. Surg.* 80, 2005: 229–36; discussion 236–7. – 7. Xu C., Wang T., Zhu Y. et al.: Cross-Talking between PPAR and WNT Signaling and Its Regulation in Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* 2015. – 8. Heldman A. W., DiFede D. L., Fishman J. E. et al.: Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA.* 311, 2014: 62–73. – 9. Shabbir A., Zisa D., Lin H. et al.: Activation of host tissue trophic factors through JAK-STAT3 signaling: a mechanism of mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299, 2010: H1428–38. – 10. Xiang M., He A., Wang J. et al.: Protective paracrine effect of mesenchymal stem cells on cardiomyocytes. *J Zhejiang Univ. Sci. B.* 10, 2009: 619–24. – 11. Bader A. M., Brodarac A., Klose K. et al.: Mechanisms of paracrine cardioprotection by cord blood mesenchymal stromal cells. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 45, 2014: 983–92. – 12. Hughey C. C., Ma L., James F. D. et al.: Mesenchymal stem cell transplantation for the infarcted heart: therapeutic potential for insulin resistance beyond the heart. *Cardiovasc. Diabetol.* 12, 2013: 128. – 13. Matsumoto R., Omura T., Yoshiyama M. et al.: Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2005: 1168–73. – 14. Nowbar A. N., Mielewicz M., Karavassilis M. et al.: Discrepancies in autologous bone marrow stem cell trials and enhancement of ejection fraction (DAMASCENE): weighted regression and meta-analysis. *BMJ.* 348, 2014: g2688–g2688. – 15. Caplan A.: Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathol.* 217, 2009: 318–24. – 16. Reardon S.: New life for pig-to-human transplants. *Nature.* 527, 2015: 152–4. – 17. Ellingsen O., Davidoff D. J., Prasad S. K. et al.: Adult rat ventricular myocytes cultured in defined medium: phenotype and electromechanical function. *Am. J. Physiol.* 265, 1993: H747–54. – 18. Mitcheson J. S., Hancox J. C., Levi A. J.: Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc. Res.* 39, 1998: 280–300. – 19. Louch W. E., Sheehan K. A., Wolska B. M.: Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer.

J. Mol. Cell Cardiol. 51, 2011: 288–98. – 20. Banyasz T., Lozinskiy I., Payne C. E. et al.: Transformation of adult rat cardiac myocytes in primary culture. Exp. Physiol. 93, 2008: 370–82.

Adresa autorky: M. M., Karlovarská 48, 301 00 Plzeň