

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Detekce nestinu ve svalu za vývoje i při poranění s
využitím *in vivo* modelu léze kosterního svalu**

ADÉLA PECHANCOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Konzultant: Bc. Petra Hajzlerová

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí této práce RNDr. Ivaně Němečkové, PhD. za pomoc při psaní bakalářské práce, trpělivé vedení a cenné rady a informace.

Dále děkuji konzultantce Bc. Petře Hajzlerové za odborné vedení experimentu, poskytnutí studijních materiálů, pomoci s orientací v problematice imunohistochemie a v neposlední řadě za věnování spousty času veškerým mým dotazům.

Mé poděkování dále patří i prof. MUDr. Jaroslavu Mokrému, PhD. a doc. MUDr. Daně Čížkové, PhD.

Nakonec bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za jejich podporu.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

PODPIS STUDENTA

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Autor: Adéla Pechancová

Název bakalářské práce: Detekce nestinu ve svalu za vývoje i při poranění s využitím *in vivo* modelu léze kosterního svalu

Vedoucí práce: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Úvod a cíl práce: Regenerace tkání i orgánů je v současnosti velmi aktuální téma. Do popředí se dostává obor regenerativní medicína, která je zaměřena na reparaci tkání. Intermediární filamentum nestin, který je považován za marker kmenových a progenitorových buněk zejména v nervové tkáni byl prokázán i v nezralých elementech svalové tkáně. Cílem této práce bylo dokázat pomocí imunohistochemických metod expresi nestinu při vývoji a při poškození kosterního svalu po injekci kardiotoxinu a následné regeneraci.

Metody: V experimentální části jsme detekovali nestin na parafínových řezech především nepřímými imunohistochemickými metodami (LSAB, EnVision FLEX kit). U parafínového řezu myšího embrya bylo cílem zachycení vývoje kosterního svalstva. U parafínového řezu poraněného svalu bérce dospělé myši pomocí injekce kardiotoxinu nám šlo o zachycení míry poškození kosterního svalu a jeho následná schopnost regenerace v různých časových intervalech.

Výsledky a závěr: Výsledky práce dokládají, že nestin je důležitý ukazatel správného embryonálního vývoje, protože se nachází ve tkáních jen v určitý časový interval. V průběhu regenerace po poranění kosterního svalu injekcí kardiotoxinu byl nestin detekován především v myoblastech a v nově se tvořících myotubách.

Klíčová slova: kosterní sval, poranění, nestin, imunohistochemie, vývoj svalu, regenerace, kardiotoxin

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Author: Adéla Pechancová

Title of bachelor's thesis: Detection of nestin during development and injury with the use of *in vivo* model of skeletal muscle lesion

Supervisor: RNDr. Ivana Němečková, PhD.

Introduction and the aim of the study: Regeneration of tissues and organs is recently very actual topic. Regenerative medicine is coming to the foreground, it is a medical field focused on reparation of tissues. Intermediate filament nestin, which is considered to be a marker of stem cells and progenitor cells especially in nerve tissue, was also detected in immature elements of muscle tissue. The aim of this study was to prove expression of nestin during development and injury of skeletal muscle after injection of cardiotoxin and it's following regeneration using immunohistochemical methods.

Methods: In the experimental part we were detecting nestin on paraffin embedded sections using mainly indirect immunohistochemical methods (LSAB, EnVision FLEX kit). The goal for the paraffin embedded section of mouse embryo was to capture the development of skeletal muscle. For the paraffin embedded section of leg muscle injured by cardiotoxin, the goal was to capture the amount of damage of the skeletal muscle and it's following ability to regenerate during various time intervals.

Results and conclusion: Results of the study prove, that nestin is important marker of the correct embryonal development, because it occurs in tissues only during specific time interval. During regeneration after injury of the skeletal muscle caused by cardiotoxin, nestin was detected mainly in myoblasts and newly forming myotubes.

Key words: skeletal muscle, injury, nestin, immunohistochemistry, muscle development, regeneration, cardiotoxin

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT	5
1. ÚVOD	8
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1 Svalová tkáň.....	10
3.1.1 Kosterní svalovina.....	12
3.2 Kardiotoxin.....	21
3.2.1 Model regenerace svalu – injekce kardiotoxinu	23
3.3 Nestin.....	24
3.4 Imunohistochemie	26
3.4.1 Imunohistochemické metody	27
3.4.2 LSAB metoda	27
3.4.3 Metoda EnVision Flex kit	29
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1 Návrh experimentu	30
4.2 Příprava roztoků	31
4.3 Hematoxylin-eosin	32
4.4 Imunohistochemická detekce.....	33
4.4.1 LSAB-HRP.....	33
4.4.2 LSAB – Cy3.....	35
4.4.3 EnVision Flex kit-HRP	36

5. VÝSLEDKY	38
5.1 Vyhodnocení snímků	38
5.1.1 Embryo	38
5.1.2 Kosterní sval 2 dny po poranění	40
5.1.3 Kosterní sval 4 dny po poranění	43
5.1.4 Kosterní sval 8 dní po poranění	46
6. DISKUSE.....	49
7. ZÁVĚR.....	51
8. POUŽITÉ ZKRATKY.....	52
9. SEZNAM TABULEK	53
10. SEZNAM OBRÁZKŮ	53
11. POUŽITÁ LITERATURA.....	55

1. ÚVOD

V posledních letech je regenerativní medicína velmi aktuálním tématem a dochází k jejímu značnému rozvoji. Tento obor je relativně mladou lékařskou disciplínou a je zaměřen na reparaci a náhradu poškozených tkání či orgánů. Jedním z intenzivně studovaných témat regenerativní medicíny jsou i kmenové buňky a jejich využití v terapii. Filamentární protein nestin ze skupiny intermediárních filament (IF) je exprimován kmenovými buňkami a je také přítomen při vývoji mnoha tkání, jako je např. nervová tkáň, srdeční svalovina či kosterní svalovina.

Kosterní svalovina tvoří podstatnou část organismu, cca 30-40 % a mezi její funkce patří hlavně pohyb organismu ovládaný vůlí. Kosterní svalová tkáň vykazuje do jisté míry i schopnost regenerace, a to hlavně díky satelitovým buňkám, což jsou v podstatě kmenové buňky nacházející se v kosterní svalovině schopné produkovat nové myofibrily. Výzkum těchto buněk svými poznatky přispívá k léčbě onemocnění kosterních svalů, jako je např. Duchennova svalová dystrofie.

Ústav histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy se zabývá problematikou regenerace tkání a kmenových buněk již desítky let. Nejprve se jednalo o výzkum regenerace nervové tkáně, později přišlo i téma regenerace kosterní svaloviny.

Tato práce je zaměřena na detekci nestinu v kosterním svalu myši jak za jeho vývoje, tak při poranění s využitím modelu kosterní léze indukované injekcí kardiotoxinu (CTX), a také na následnou regeneraci svalu.

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je podat ucelenou informaci především o imunohistochemické detekci nestinu při vývoji kosterního svalstva u myšího embrya a také při poranění a regeneraci kosterního svalu zadní končetiny u dospělé myši za použití kardiotoxinu v různých časových intervalech přežití.

Důležitým úkolem této práce je zpracovat výsledky imunohistochemických detekcí a popsat expresi nestinu, jak při vývoji kosterního svalstva, tak při poranění a následné regeneraci kosterního svalu.

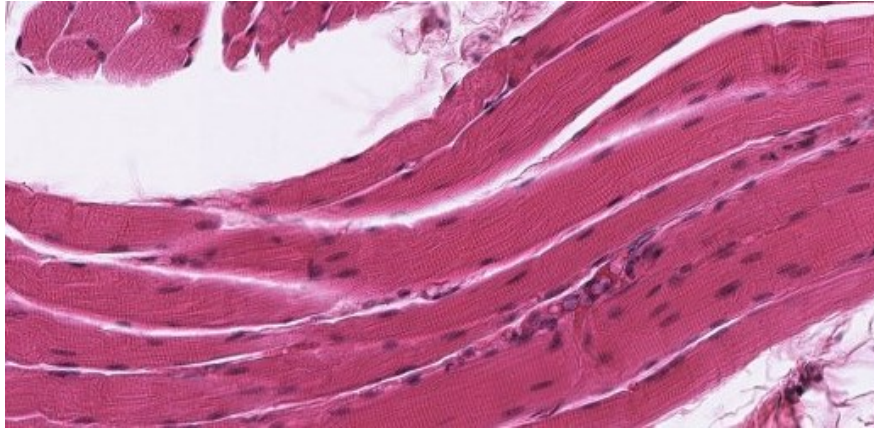
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Svalová tkáň

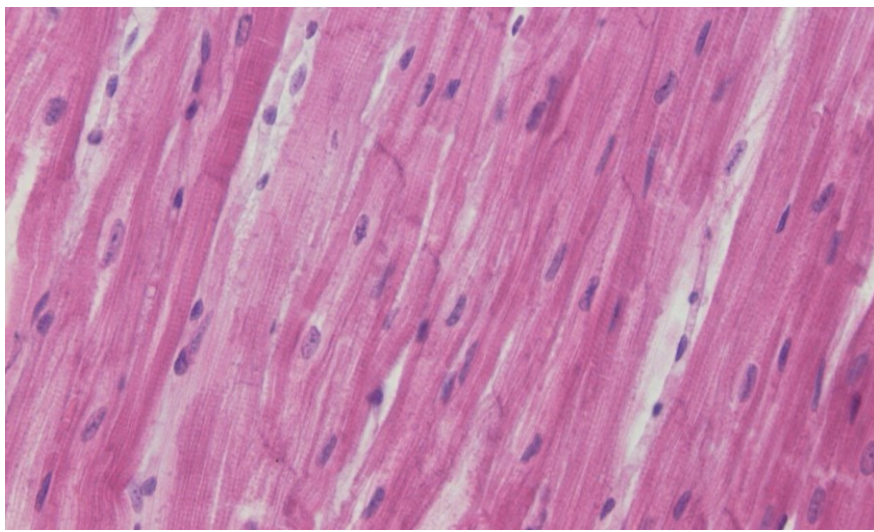
Představuje jeden ze čtyř základních typů tkání, kromě svalové tkáně sem zařazujeme epitelovou tkáň, pojivovou tkáň a nervovou tkáň. Základní charakteristikou této tkáně je schopnost kontrakce a relaxace a také vzrušivost. Svalová kontrakce je ve svalových buňkách vyvinuta za pomoci aktinových mikrofilament a k nim přidružených proteinů, což vede jak k pohybu v orgánových systémech, tak k pohybu těla jako celku. Vlákná aktinu a myosinu vytvářejí kontraktilní jednotky, které mění chemickou energii na mechanickou prostřednictvím hydrolýzy adenosintrifosfátu (ATP). Tyto proteiny se nenachází pouze ve svalových buňkách, ale v každé buňce lidského organismu. Umožňují zde pohyb jednotlivých organel v rámci buňky, fagocytózu nebo aktivní pohyb buněk. Svalové buňky jsou mezodermového původu a postupně se diferencují prodlužováním a syntézou aktinu a myosinu. (Anthony L. Mescher, 2018; Hudák et al., 2017)

Podle morfologických a funkčních vlastností rozlišujeme tři typy svalové tkáně:

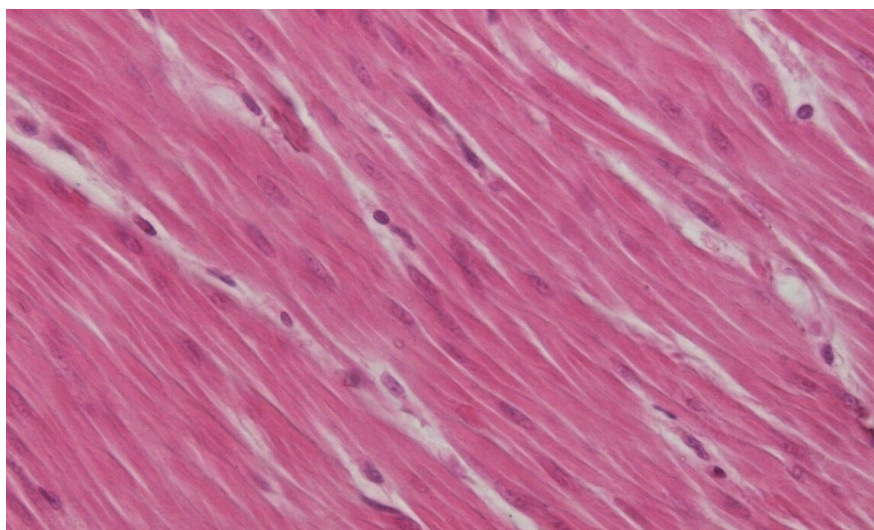
- Kosterní svalovina – skládá se ze svazků dlouhých mnohojaderných vláken s příčným žíháním (Obrázek I). Kontrakci je schopna provádět rychle a silně, je ovladatelná vůlí.
- Srdeční svalovina – také zde se vyskytuje příčné žíhání, buňky jsou podlouhlé a rozvětvené, vzájemně propojené interkalárními disky, které jsou charakteristickým znakem tohoto typu svaloviny (Obrázek II). Kontrakci nelze ovládat vůlí, je rytmická a silná.
- Hladká svalovina – buňky jsou vřetenovitého tvaru bez příčného žíhání (Obrázek III), kontrakce je pomalá a vůlí neovladatelná. (Anthony L. Mescher, 2018)



Obrázek I Podélný řez kosterní svalovinou, barveno HE, zvětšení 200x, foto: Smartzoom, LFHK



Obrázek II Podélný řez srdeční svalovinou, barveno HE, zvětšení 400x, foto: Ústav histologie a embryologie, LFHK

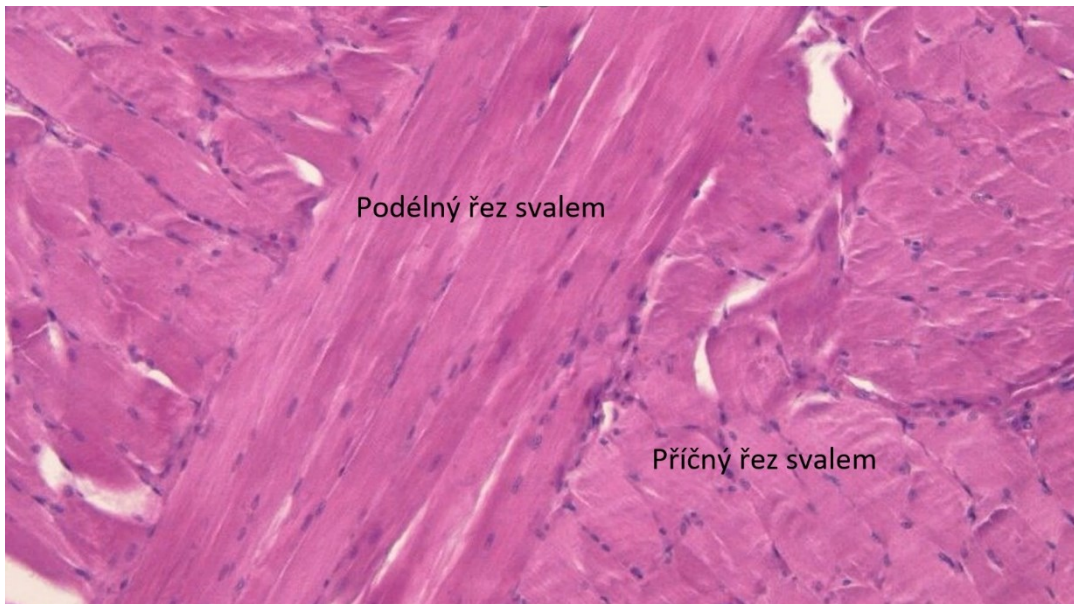


Obrázek III Podélný řez hladkou svalovinou, barveno HE, zvětšení 400x, foto: Ústav histologie a embryologie, LFHK

3.1.1 Kosterní svalovina

Lidské tělo je tvořeno z cca 40 % kosterní svalovinou, svaly umožňují veškeré pohyby potřebné k práci, mluvení, psaní a mnoho dalšího. Svalová kontrakce je silná a ovladatelná vůlí. Kosterní svalovina je inervována zejména axony alfa-motoneuronů. Svaly se mohou nacházet samostatně nebo vytvářet skupiny. Povrch svalů kryje fascie tvořená hustým kolagenním vazivem. Jednotlivé svaly jsou složeny ze svalových snopců, ty obsahují svalová vlákna, což jsou základní stavební jednotky svalu. Svalová vlákna jsou dlouhá mnohojaderná syncytia (soubuní) cylindrického tvaru o průměru 10-100 μm , obsahují až několik set jader a tvarem připomínají dlouhé válce. V průběhu embryonálního vývoje dochází k fúzi rostoucích myoblastů mezenchymového původu v myotuby. Myoblast je embryonálním prekurzorem svalových vláken, jedná se o jednojaderné vřetenovité buňky bez myofibril. Myotuby jsou mnohojaderné buňky válcovitého tvaru, které ve své sarkoplasmě obsahují myofibrily. Dále dochází k diferenciaci myotub ve vlákna kosterních svalů. Vlákna mají protáhlá a oploštěná tmavá jádra nacházející se na periferii pod sarkolemou (cytoplazmatická membrána svalových buněk), což je charakteristickým znakem kosterní svaloviny. Diferencované svalové vlákno již nemá schopnost dělení. K většině vláken také přiléhají progenitorové buňky, takzvané satelitové, které představují rezervu pro regeneraci kosterní svaloviny. Mají schopnost se rychle dělit a vznikají tak nová svalová vlákna podobně jako u myoblastů. Tyto buňky jsou schopny regenerace kosterního svalu, ovšem pouze pokud nedojde k poškození bazální laminy. Pokud k porušení dojde, tkáň se hojí vazivovou jizvou. Schopnost kontrakce je zkrácena a sval v místě poranění ztrácí svou funkci. (Anthony L. Mescher, 2018; Dylevský, 2009; Hudák et al., 2017)

Na příčném řezu svalovinou (Obrázek IV) jsou patrné vřetenovité protáhlé buňky s tmavými jádry s kondenzovaným chromatinem, která jsou utlačována těsně pod sarkolemu. Na podélném řezu (Obrázek IV) je viditelné příčné žíhání charakteristické pro kosterní svalovinu. Příčné žíhání je zapříčiněno uspořádáním proteinů aktinu a myosinu, toto uspořádání vykazuje i srdeční svalovina, ale kvůli mnohým odlišnostem je vyčleněna jako samostatný typ vedle hladké a kosterní svaloviny. (Hudák et al., 2017; Maratová, 2013)



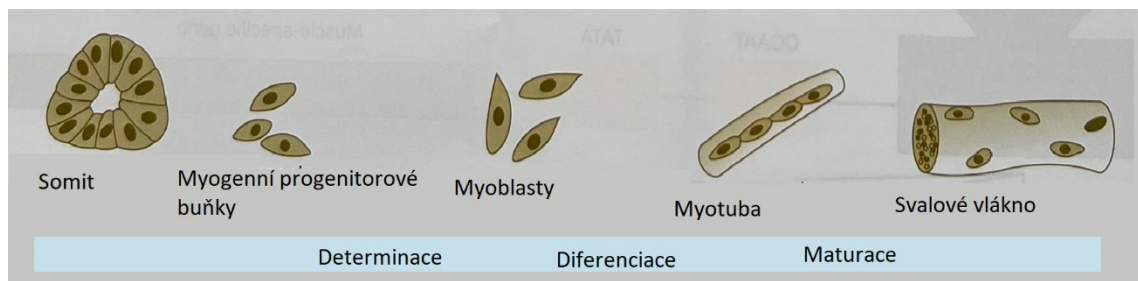
Obrázek IV Řez kosterním svalem, barveno HE, zvětšení 100x, foto: Smartzoom, LFHK

Svalové vlákno je na povrchu ohraničeno sarkolemou, která se skládá ze tří vrstev - plazmatické membrány, bazální laminy a jemné sítě retikulárních vláken. Invaginací plazmatické membrány se vytváří systém T-tubulů, což jsou vzájemně propojené sítě kanálků uvnitř sarkoplazmy. T-tubuly převádí nervový vzruch z povrchu svalového vlákna na myofibrily a umožňují tak synchronizaci kontrakce. Tento systém kanálků se nachází kolem jednotlivých myofibril a napojuje se na terminální cisterny sarkoplazmatického retikula (SR). Sarkoplazma neboli cytoplazma svalového vlákna obsahuje několik specifických struktur, organel a látek. Myofibrily vyplňují téměř celou sarkoplazmu. Uvnitř sarkoplazmy se také nachází velké množství mitochondrií neboli sarkozomů, které mají za úkol zajistit energii pro kontrakci svalu. Důležitou organelou pro kontrakci je rovněž sarkoplazmatické retikulum. Dělí se na hladké a drsné sarkoplazmatické retikulum. Hladké SR skladuje vápenaté ionty potřebné pro spouštění svalového stahu, L-cisterny uložené podélně a terminální cisterny uložené příčně. Drsné SR má na starosti zejména proteosyntézu. Na jeho membráně se nacházejí ribozomy, které syntézu polypeptidového řetězce provádějí. Po průchodu do lumen drsného SR dochází ke glykosylaci proteinů. K dalším látkám, které sarkoplazma obsahuje, řadíme shluky glykogenu a tukové kapénky, které slouží jako energetická zásoba, kreatinfosfát zásobující buňku makroergními fosfátovými skupinami, a také myoglobin sloužící jako nouzová zásoba kyslíku. Obsah myoglobinu ovlivňuje zbarvení svaloviny. (Hudák et al., 2017; Slípka & Tonar, 2018)

3.1.1.1 Vývoj kosterní svaloviny

Všechny kosterní svaly mají svůj původ v somitech nebo somitomerech, což jsou segmenty paraaxiálního mesodermu. Vývojem somitů (Obrázek V) vzniká mimo jiné i myotom, ze kterého vznikají myogenní buňky. Vypadají jako mezenchymální kmenové buňky, ze kterých se dále může vyvinout mnoho různých typů buněk, ale myogenní buňky prošly diferenciací a mohou tak produkovat pouze svalové buňky. Takto specializované myogenní buňky projdou několika mitózami a po dokončení terminálního mitotického dělení se z nich stávají postmitotické myoblasty. (Carlson, 2018)

Myogenní buňky podléhají buněčnému dělení pod vlivem několika růstových faktorů, jako na příklad fibroblastový růstový faktor (FGF) a transformační růstový faktor beta (TGFβ). Genovou expresí kontrolují myogenní regulační faktory jejichž akumulací dojde v myogenních buňkách k up-regulaci syntézy proteinu p21 a buněčné dělení je nevratně zastaveno. Poté, pod vlivem dalších růstových faktorů, začíná v postmitotických myoblastech proces transkripce mRNA pro hlavní kontraktilní proteiny aktin a myosin. Postmitotické myoblasty splývají dohromady a vznikají tak myotuby. Myotuby intenzivně syntetizují jak mRNA, tak proteiny. Kromě syntézy aktinu a myosinu, dochází také k produkci dalších proteinů, včetně proteinů regulujících svalovou kontrakci – troponinu a tropomyosinu. Všechny tyto proteiny dávají vzniknout myofibrilám, což jsou základní kontraktilní jednotky svalových buněk. Myotuby jsou postupně vyplňovány myofibrilami, které utlačují jejich jádra až na periferii. V tomto stádiu již hovoříme o svalových vláknech, která se diferenciovala z myotub. Jedná se o závěrečné stadium diferenciaci buněk kosterní svaloviny. (Carlson, 2018)

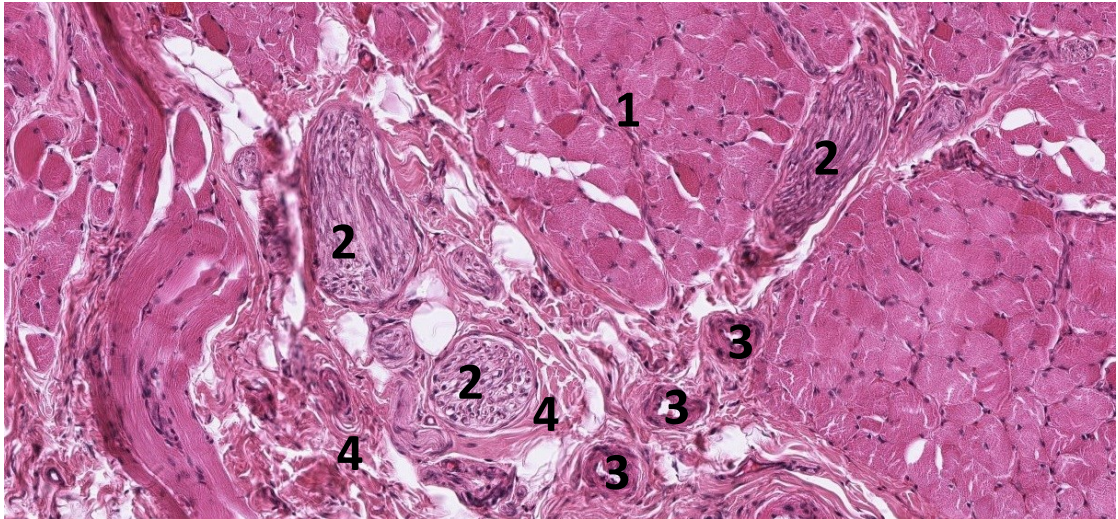


Obrázek V Vývoj svalu, převzato a upraveno z: Carlson, 2018

Vývoj svalových vláken ale stále není kompletní. Jádra mnohояderných svalových vláken již nejsou schopná dělení, ale svalové vlákno dále roste za pomoci populace

myogenních buněk, které nazýváme satelitní buňky. Nachází se mezi svalovým vláknem a bazální laminou, která obklopuje svalové vlákno. Satelitní buňky zajišťují schopnost regenerace svalu, ta je ale značně omezena. (Carlson, 2018)

Svalovou tkáň netvoří pouze svalová vlákna, ale také pojivová tkáň, krevní cévy a nervy (Obrázek VI). V průběhu vývoje svalů dochází k promísení myoblastů a budoucí pojivové tkáně. (Carlson, 2018)



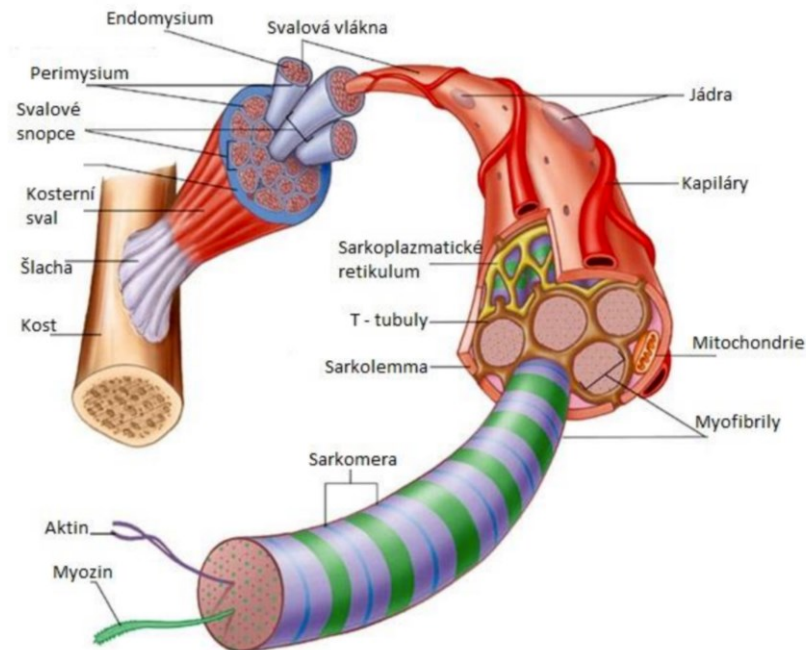
Obrázek VI Řez kosterní svalovinou, barveno HE, zvětšení 200x, foto: Smartzoom, LFHK; 1-svalová tkáň, 2-nervy, 3-krevní cévy, 4-husté kolagenní vazivo (HKV)

Pojivová tkáň ovlivňuje výslednou formu svalu více než samotné myoblasty. Myogenní buňky jsou navzájem zaměnitelné, což znamená, že buňky ze somitů, ze kterých by se normálně tvořily svaly trupu se mohou účastnit formace svalů končetin. Buňky pojivové tkáně tuto schopnost záměny nemají. Kapiláry prorůstají do vyvíjejícího se svalu krátce po zformování prvních myotub, stejně tak vlákna motorických nervů. (Carlson, 2018)

3.1.1.2 Stavba kosterního svalu

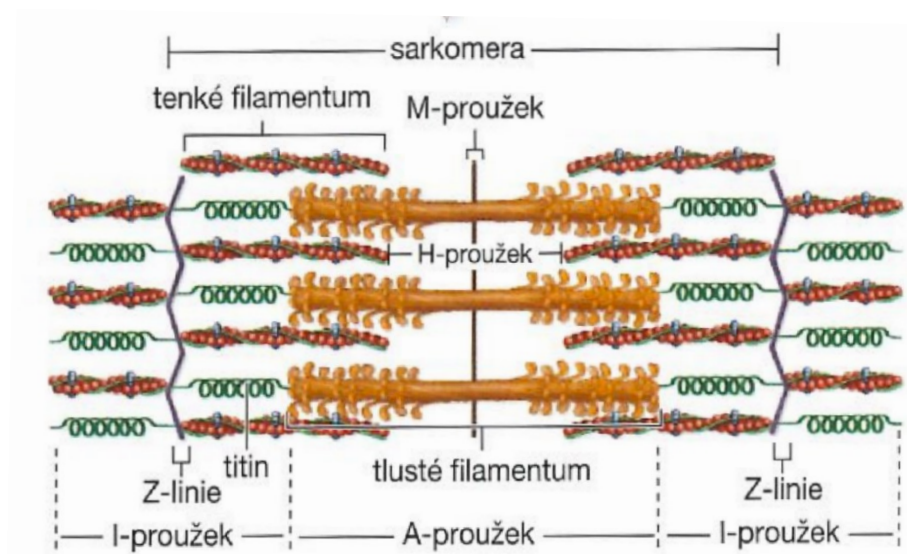
Kosterní sval se skládá z několika vrstev vaziva obklopujícího kontraktilní elementy (Obrázek VII). Každý svazek svalových vláken je obklopen vrstvou kolagenního vaziva, kterou nazýváme perimysium. Svazek svalových vláken obklopený perimysiem tvoří funkční jednotku svalu, kde všechna vlákna pracují společně. Krevní zásobení a inervaci zprostředkovávají nervy a cévy pro každý svazek a pronikají skrz perimysium. Uvnitř jednotlivých svazků se nachází endomysium, které obklopuje bazální laminu svalových vláken. Endomysium je tvořeno velmi tenkou vrstvou retikulárních vláken a roztroušených fibroblastů. Nachází se zde nejen nervová vlákna, ale i bohatá síť kapilár dodávající kyslík svalovým vláknům. Na povrchu celého svalu se nachází epimysium, takzvané vnější pouzdro. Je složeno z hustého neuspořádaného kolagenního vaziva. Z epimysia odstupují jednotlivá septa, která přivádějí do svalu větší nervy a cévy. (Anthony L. Mescher, 2018; Jarkovská & Martínek, 1997)

Jednotlivá svalová vlákna jen výjimečně protínají celý sval od jednoho konce k druhému. K přenosu sil vyvíjených smršťujícími se svalovými vlákny slouží kolagenní vlákna v těchto vazivových vrstvách. Spolu s vazivem hluboké fascie, která se nachází na povrchu epimysia, přecházejí tyto tři vrstvy vaziva v husté kolagenní vazivo šlachy. Místo tohoto přechodu se nazývá myotendinózní spojení. Zde se připojuje sval ke kosti, kůži nebo k dalšímu svalu. (Anthony L. Mescher, 2018; Jarkovská & Martínek, 1997)



Obrázek VII Stavba kosterního svalu, převzato z: Uher, 2016

Myofibrily jsou dlouhé svazky filament cylindrického tvaru, které na sobě mají proužky, a to A-proužky a I-proužky. A-proužky jsou tmavé, dobře barvitelné a anizotropní. I-proužky jsou světlé, skládají se z částí tenkých filament, které nejsou v překryvu se silnými filamenti. Jsou izotropní, což znamená, že nevykazují dvojlom světla. I-proužky jsou příčně protnuty tmavou linií, kterou nazýváme Z-linie. Úsek mezi dvěma Z-liniami nazýváme sarkomera (Obrázek VIII), což je funkční a strukturální jednotka myofibril. (Anthony L. Mescher, 2018.)



Obrázek VIII Sarkomera, převzato z: Anthony L. Mescher, 2018

V každé myofibrile se nachází myofilamenta složená z myosinu a F-aktinu, která jsou uspořádána pravidelně a symetricky. To má za následek střídání A a I-proužků v sarkomerách. Myosinová filamenta, tzv. silná vlákna, jsou široká 15 nm a nachází se v A-proužku ve střední části sarkomery. Vlákna myosinu vykazují ATP-ázovou aktivitu. Myosinové hlavičky tvořené čtyřmi lehkými řetězci myosinu tvoří přechodné vazby mezi myosinovým a aktinovým filamentem a jsou katalyzátorem rozštěpení makroergní vazby ATP, čímž se uvolňuje energie. Aktinová filamenta jsou široká 8 nm, probíhají mezi myosinovými filamenty. Polymerací globulárního G-aktinu vzniká fibrilární F-aktin, který má tvar dvojité šroubovice. Každý G-aktin obsahuje vazebné místo pro myosin. Na tenká filamenta jsou těsně připojeny dva regulační proteiny: tropomyosin a troponin. (Anthony L. Mescher, 2018; Rayment, 1996)

Svalová vlákna mají své charakteristické uspořádání, tzv. příčné žíhání, které můžeme pozorovat na podélném řezu tkání. Toto uspořádání je dáno střídáním světlých a tmavých pruhů. Na příčném řezu není žíhání patrné, naopak zde můžeme vidět svazky myofibril, které jsou od sebe odděleny sarkoplazmou. Tyto svazečky se nazývají Conheimova políčka. (Farlex Partner Medical Dictionary, b.r.), (Anthony L. Mescher, 2018.)

3.1.1.3 Mechanismus kontrakce kosterního svalu

Kontrakce je navozena přestupem akčního potenciálu přes nervosvalovou ploténku na terminální cisterny sarkoplazmatického retikula. Potenciál je veden sarkolemou přes T-tubuly, dlouhé invaginace membrány, které pronikají hluboko do sarkoplazmy a nacházejí se kolem každé myofibrily. Na jednotlivé T-tubuly přiléhají terminální cisterny sarkoplazmatického retikula a tvoří triádu, což je komplex dvou cisteren a jednoho tubulu. Triády umožňují přenos potenciálu z T-tubulů na sarkoplazmatické retikulum, což vede k uvolnění vápenatých kationtů. Tyto ionty se vážou na troponin, a tím uvolní troponin-tropomyosinový komplex z F-aktinu. Na F-aktinových filamentech dojde k odhalení vazebných míst pro myosin a může dojít k vytvoření vazby. Vazbou na aktin se myosin ohne směrem k Z-linii a změní konformaci, čímž vtáhne aktinová filamenta více do A-proužku. Energie potřebná pro ohnutí myosinu je získávána pomocí hydrolýzy ATP navázaného na hlavičce myosinu, ten poté váže další molekulu ATP a vazba

s aktinem se přeruší. Dokud jsou přítomny vápenaté ionty a ATP, dochází k opakování těchto kroků: vazba aktinu a myosinu, ohnutí hlavičky, uvolnění vazby. Tento tříkrokový cyklus trvá přibližně 50 milisekund, svalová kontrakce se skládá ze stovek takových cyklů. Jakmile odezní nervový impuls a klesne koncentrace vápenatých iontů, dojde k opětovnému zakrytí vazebného místa pro myosin pomocí tropomyosinu. Filamenta se pasivně vrací zpět a kontrakce sarkomer ustává. (Anthony L. Mescher, 2018; Brooks, 2003)

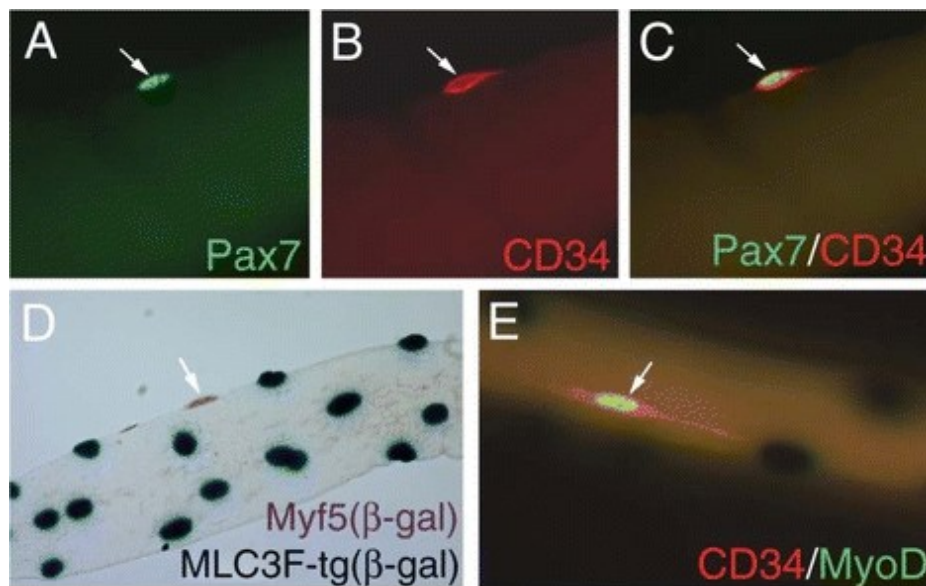
3.1.1.4 Regenerace kosterního svalu

Při regeneraci se poškozená tkáň nahrazuje funkčně i morfologicky rovnocennou tkání, jedná se o komplexní proces. Regenerace může být fyziologická, ta probíhá v organismu téměř neustále, např. regenerace kůže, epitelu dutiny ústní nebo kostní dřeně. Naproti tomu při reparativní regeneraci dochází k náhradě odumřelých či ztracených tkání nově vytvořenými. Schopnost reparativní regenerace je u savců omezena. Při regeneraci se opakují určité vývojové fáze z prenatálního vývoje dané tkáně či orgánu. Klíčovými prvky regenerace pro novotvorbu buněk jsou kmenové buňky. (Čížková, 2019; Srour et al., 2015)

Populace kmenových buněk vykazuje zcela odlišné vlastnosti oproti ostatním buňkám. Kmenové buňky nejsou zralé ani diferencované a mají tudíž možnost výrazné proliferace a jejich regenerace je téměř neomezená. Kmenové buňky se dělí asymetricky, z mateřské kmenové buňky vznikají kromě diferencovaných buněk i další naprosto identické kmenové buňky. Kmenové buňky je možné najít téměř v každé tkáni a orgánu, svými vlastnostmi se však od sebe v průběhu vývoje organismu odlišují. Rozdělit je můžeme dle jejich možností diferenciací v různé typy tkání na kmenové buňky totipotentní, pluripotentní a tkáňově specifické. Totipotentní kmenové buňky vznikají ze zygoty a jsou schopné diferencovat v jakýkoli typ tkáně. Pluripotentní buňky jsou buňky embryoblastu a mají schopnost diferenciací pouze v buňky tkání daného zárodečného listu (ektoderm, endoderm, mezoderm). Z buněk zárodečných listů se pak v průběhu vývoje tvoří kmenové buňky již tkáňově specifické, právě tyto buňky jsou klíčové pro embryonální a fetální vývoj. Postnatálně jsou stále aktivní, zejména v dětském

organismu. V dospělosti jsou v klidovém stavu a aktivují se pouze při potřebě regenerace. (Čížková, 2019)

Kmenové buňky v kosterní svalovině se nazývají buňky satelitové (Obrázek IX), nacházejí se mezi sarkolemou a bazální laminou. Jsou schopny sebeobnovy a diferenciaci v myogenní progenitorové buňky. Za normálních podmínek jsou v klidovém stavu, aktivovány jsou při regeneraci kosterního svalu. Dochází k jejich proliferaci a diferenciaci. Ve zdravém organismu je možné mnohokrát plně zregenerovat kosterní sval, funkce satelitových buněk ale může být snížena vlivem degenerativních onemocnění nebo např. stárnutí organismu. Satelitové buňky jsou nenahraditelnou součástí procesu regenerace při poranění svalu. Mezi satelitovými buňkami se vyskytuje mírná heterogenita v rychlosti dělení a diferenciaci, schopnosti vlastní regenerace a jejich klonální kapacitě. Satelitové buňky se mohou lišit svými vlastnostmi mezi různými svaly, ve kterých se nacházejí, ale i v rámci jednoho svalu. (Čížková, 2019; Wang et al., 2022)



Obrázek IX Satelitové buňky, převzato z: (Zammit et al., 2006)

Regenerace má 3 fáze, které spolu úzce souvisí a vzájemně se prolínají: fáze zánětlivá, fáze aktivace a diferenciaci satelitových buněk a fáze vyzrávání. V první fázi infiltrují leukocyty poškozenou tkáň a odstraní nekrotické zbytky vláken. Jako první se do tkáně dostávají neutrofilní granulocyty a poté monocyty, které se po vniknutí do tkáně diferencují v makrofágy. Látky uvolňované monocyty a makrofágy rovněž přispívají k procesu regenerace svalové tkáně. Ve druhé fázi jsou aktivovány satelitové buňky,

proliferují, diferencují se. Za pomoci fúze formují nová svalová vlákna, kterými nahradí poškozenou tkáň, nebo se stávají myogenními progenitorovými buňkami. Ve třetí fázi dochází k maturaci nově formovaných svalových vláken a remodelaci poškozeného svalu. (Čížková, 2019; Vaittinen et al., 2001; Wang et al., 2022)

Regenerace je vysoce koordinovaný proces, exprese genů účastnících se regenerace je regulována v prostoru i čase. Regulaci zprostředkovávají signály ze specializovaného mikroprostředí z buněčných i nebuněčných složek, tzv. niche (francouzsky okénko, výklenek), kde se nachází satelitové buňky, a vnitřní signální dráhy, které regulují funkci satelitových buněk. (Čížková, 2019)

Pro studium procesu regenerace se využívají experimentální modely poranění kosterního svalu, nejčastěji u myši a potkanů. Tyto modely umožňují provádět kontrolované experimenty, jejichž výsledky jsou reprodukovatelné a vzájemně porovnatelné. Mezi nejčastěji používané modely v současnosti patří mytoxické látky (kardiotoxin, notexin), chemikálie (chlorid barnatý) a fyzikální způsoby (zmrazení, rozdrcení, ozáření, transplantace aj.). (Hardy et al., 2016)

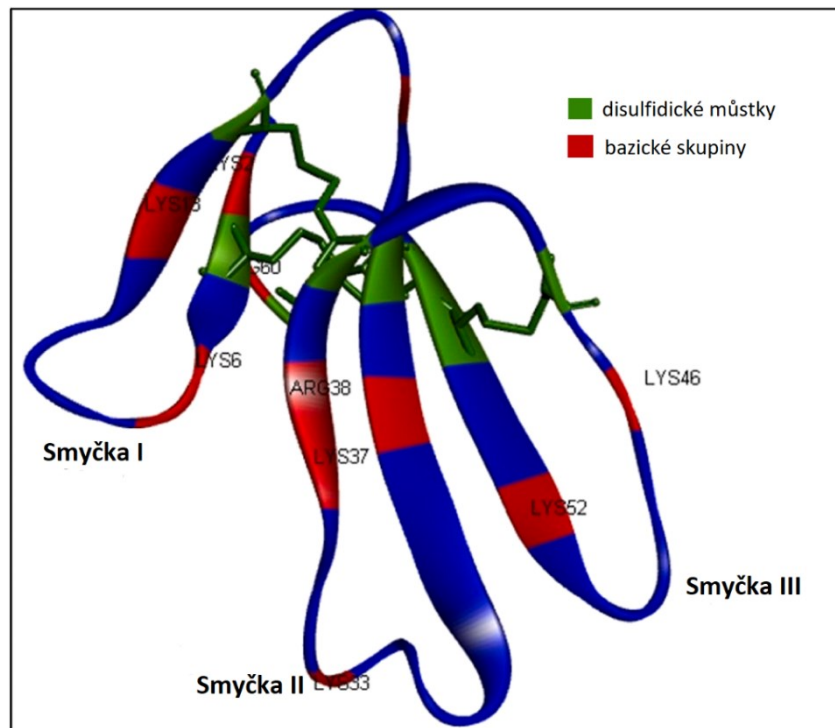
3.2 Kardiotoxin

Kardiotoxin je mytoxická látka obsažená v jedu kobry. Nejčastěji používanými druhy pro výzkum jsou kobra mosambická (*Naja mossambica*) a kobra čínská/tchajwanská (*Naja atra*). Obsah kardiotoxinu v kobřím jedu je 40-60 % dle druhu kobry a také dle geografického výskytu. (Čížková, 2019; Hiu & Yap, 2022)

Svůj název nese podle účinků na srdce, vede k rozvoji arytmií nebo až k srdeční zástavě. Kardiotoxiny vykazují relativně rozsáhlé spektrum biologických účinků, jako např. depolarizace a kontrakce svalových elementů, agregace krevních destiček, lýza erytrocytů, neurotoxicita nebo interakce s mitochondriemi vazbou na kardiolipin, kdy dochází k indukci apoptózy. (Čížková, 2019; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2019)

Kardiotoxiny jsou malé (cca 60 aminokyselin) amfifilní bazické polypeptidy obsahující rigidní prostorovou strukturu tvořenou antiparalelními β -listy a třemi prodlouženými smyčkami (Obrázek X). Na každém konci smyček se nachází kladně nabitě zbytky aminokyselin lysinu a argininu. Struktura kardiotoxinů se u kober mezidruhově neliší,

zůstává zachována, zejména se jedná o centrální hydrofobní jádro tvořené třemi smyčkami, které determinují toxicitu kardiotoxinu. CTX klasifikujeme do dvou skupin podle jejich aminokyselinového složení, S-typ a P-typ. S-typ obsahuje serinové zbytky ve smyčce II, P-typ v této smyčce obsahuje zbytky prolinu. P-typ má více kladný náboj oproti S-typu, je více hydrofobní a je považován za více cytotoxickou formu. (Dubovskii et al., 2005; Hiu & Yap, 2022; Zhang et al., 2019)



Obrázek X - Struktura kardiotoxinu, převzato a upraveno z: (Hiu & Yap, 2022)

Cytotoxický efekt CTX je způsoben jejich interakcemi s lipidy a biologickými membránami, a to elektrostatickými a hydrofobními interakcemi, tvorbou izotropní fáze nebo oligomerizací. Jako první dochází při vazbě CTX na membránu k elektrostatickým interakcím, zde ještě nedochází k průchodu CTX membránou (non-insertion mode). Elektrostatické interakce přechází v hydrofobní, které jsou zprostředkovány pouze smyčkami II a III. Ty jsou schopny proniknout lipidovou dvojvrstvou (insertion mode). Jakmile je CTX inkorporován do membrány, vzniká izotropní fáze a formuje se komplex CTX a lipidů s neutrálním nábojem. Oligomery CTX vytvářejí póry uvnitř fosfolipidových membrán. Tyto interakce způsobují strukturální defekty v lipidových membránách, což vede k dalším patologiím a cytotoxickým efektům. (Dubovskii et al., 2005; Hiu & Yap, 2022; Zhang et al., 2019)

Přesný mechanismus cytotoxicity není plně objasněn. Zahrnuje nejen cytolytické kroky, ale zasahuje i do signálních drah buněčné smrti. Kardiotoxin může aktivovat jak vnější dráhu apoptózy přes receptory smrti, tak vnitřní dráhu buď pomocí interakce s kardiolipiny v membráně mitochondrií, kdy dojde k jejich fragmentaci, nebo fosforylací faktoru mitochondriálního dělení. Další možností aktivace buněčné smrti je lyzozomy zprostředkovaná nekróza a také nekroptóza (nekróza s prvky regulace, indukce specifickými stimuly). Kromě aktivace buněčné smrti dochází i k zastavení buněčného cyklu. (Dubovskii et al., 2005; Hiu & Yap, 2022; Zhang et al., 2019)

Kardiotoxin vykazuje antiproliferativní aktivitu vůči nádorovým buňkám a je proto potenciálním kandidátem v terapii rakoviny. (Zhang et al., 2019)

3.2.1 Model regenerace svalu – injekce kardiotoxinu

Při použití modelu regenerace kosterního svalu za pomoci injekce kardiotoxinu je výhodou selektivní působení na svalová vlákna, aniž by byly výrazně postiženy krevní cévy, nervy nebo satelitové buňky, které jsou nepostradatelnou součástí procesu regenerace svalu. Tento model zároveň poskytuje jednotné poškození v celém svalu a synchronizovanou regeneraci. Další nespornou výhodou je relativně nízká újma experimentálních zvířat v porovnání s jinými nefyziologickými modely, jako např. mechanické poranění svalu. (Čížková, 2019; Wang et al., 2022)

Kardiotoxin lyzuje plazmatické membrány myofibril, ty poté velice rychle od podání injekce nekrotizují, již po 30 minutách. Po několika hodinách dochází k infiltraci poškozené oblasti neutrofilními granulocyty, spolu s makrofágy fagocytují do 24 hodin zbytky nekrotizovaných myofibril. V průběhu druhého dne od podání injekce se zde začínají objevovat myoblasty, následující den se již začínají tvořit nové myotuby. Myotuby vyžívají ve svalová vlákna, dochází k tzv. marginaci jader, což vede k jejich migraci ze středu buňky na její periferii (Couteaux et al., 1988). V tomto modelu regenerace je zregenerovaný sval morfologicky mírně odlišný od svého původního nepoškozeného uspořádání. Rozdíly můžeme pozorovat v uspořádání svazků myofibril a motorických plotének. Odlišná organizace tkáně je dána přetrváváním bazální laminy svalových vláken v úvodních fázích poškození svalu. Původní bazální lamina nepodléhá lýze a při vývoji nových svalových buněk slouží jako mechanická opora, ve výsledku pak

bazální lamina obklopuje několik nově vytvořených myotub, které získávají vlastní bazální laminu až později. Při normální myogenezi má každá vyvíjející se myofibrila svou vlastní bazální laminu. (Čížková, 2019; Wang et al., 2022)

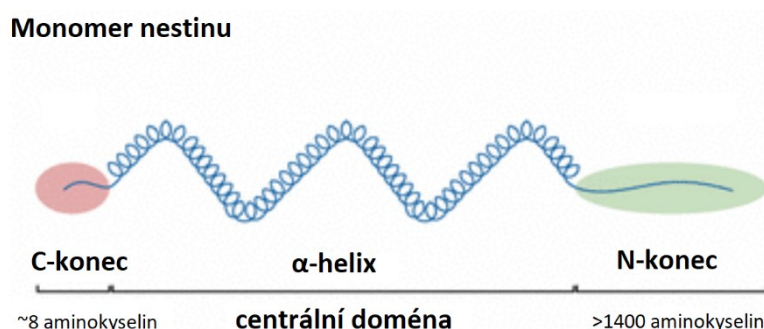
3.3 Nestin

Cytoskelet se u eukaryotních buněk skládá ze tří základních typů filament: aktinová mikrofilamenta, mikrotubuly a intermediární filamenta. Nestin je filamentární protein, který je součástí intermediárních filament. Existuje více než 50 typů IF, které se dělí do 6 tříd, a to dle struktury genu – uspořádání intronů a exonů. Nestin se řadí do VI. skupiny intermediárních filament. Klasifikace IF se průběžně mění a dochází tak k nejednotnosti v současné literatuře (Tabulka 1). IF obklopují jádro svou cytoplazmatickou sítí, odtud dosahují až na periferii buněk a zde bývají zakotvena do membrány. IF jsou nejodolnější ze všech tří typů filament, vykazují výraznou pevnost v tahu, čímž buňkám umožňují překonat mechanický stres při jejich natažení. IF a jejich prekurzory jsou dynamickou součástí cytoskeletu. (Cooper, 2019; Čížková, 2019; Tampaki et al., 2014)

Tabulka 1 - Klasifikace IF, upraveno dle: Cooper, 2019

Typ IF	Protein	Mr [kDa]	Charakteristický výskyt
I	Kyselé keratiny (~ 15 proteinů)	40-60	Epitelové buňky
II	Neutrální nebo bazické keratiny (~15 proteinů)	50-70	Epitelové buňky
III	Vimentin Desmin GFAP Peripherin	54 53 51 57	fibroblasty, leukocyty, aj. svalové buňky gliové buňky periferní neurony
IV	Neurofilamentární proteiny: NF-L NF-M NF-H A-inetrnixin	67 150 200 66	Neurony
V	Jádrové laminy	60-75	Jádrová lamina všech buněčných typů
VI	Nestin	200	Kmenové buňky (zejm. CNS)

Nestin je složen z více než 1600 aminokyselin, má krátký N konec a dlouhý C konec (Obrázek XI). Oba konce interagují s ostatními intermediárními filamenti (zejm. s IF třídy III a IV) a vznikají tak heterodimery a smíšené polymery. Není však schopen formovat homopolymery, tak jako ostatní filamentární proteiny patřící mezi intermediární filamenta, pravděpodobně kvůli svému krátkému N-konci. Dlouhé C-konce nestinu umožňují propojení IF, mikrofilament a mikrotubulů pomocí spojovacího můstku. Nestin se také podílí na průběhu mitózy spolu s vimentinem. (Čížková, 2019; Tampaki et al., 2014; Vařejčková, 2012)



Obrázek XI Struktura monomeru nestinu, převzato a upraveno z: (Bernal & Arranz, 2018)

Poprvé byl nestin popsán v roce 1985 v kmenových buňkách centrálního nervového systému, konkrétně v mozku, a to jak za vývoje, tak u dospělých jedinců. Název nestin pochází z angličtiny, jedná se o akronym slov **neuroepithelial stem cell protein** (protein neuroepiteliálních kmenových buněk). (Čížková, 2019; Tampaki et al., 2014)

Obecně je nestin považován za marker kmenových a také progenitorových buněk, zejména v CNS. V průběhu vývoje zde při diferenciaci na nervové a gliové buňky dochází k potlačení exprese nestinu a postupně je nahrazován neurofilamenty a gliovými fibrilárními kyselými proteiny. Nestin hraje důležitou roli při migraci a diferenciaci kmenových buněk. Dalšími buňkami produkujícími nestin jsou prekurzorové buňky svalové tkáně. Exprese nestinu byla rovněž pozorována při vývoji srdeční tkáně, kostní dřeně, varlat či zubní tkáně. Fyziologicky je nestin v buňkách přítomen jen v určitém vývojovém období. V průběhu embryogeneze je exprimován při migraci a proliferaci buněk a během diferenciaci je nahrazen jiným IF. V dospělé tkáni lze nestin pozorovat při obměně tkání, regeneraci a hojení, revaskularizaci anebo nádorovém bujení. Při

těchto procesech se opakují vývojové fáze, což vyvolává expresi nestinu. (Čížková, 2019; Hardy et al., 2016; Mokrý et al., 2004; Tampaki et al., 2014)

Expresie nestinu je vysoce regulovaný proces. Fyziologicky dochází k up-regulaci exprese při embryogenezi v různých tkáních, a naopak down-regulaci v průběhu maturace. Pokud dojde k poškození tkáně, nestin je produkován buňkami, které mají vlastnosti progenitorů. Tyto buňky se chovají jako rezervní tkáň a účastní se procesu reparace. Expresí nestinu dochází k aktivaci transformujícího růstového faktoru beta, migraci buněk a k narušení cytoskeletu. (Tampaki et al., 2014; Vaittinen et al., 2001)

Roli hraje i při rozvoji rakoviny. Přispívá k agresivitě nádorových buněk a zároveň se účastní angiogeneze tumorů a podporuje tak jejich růst. Expresie nestinu byla pozorována u několika typů malignit, jako je osteosarkom, neuroblastom, gliom, melanom, rakovina slinivky či prostaty a také nádory krevních cév. Nestin je považován za nádorový biomarker, umožňuje charakterizovat invazivní fenotyp nádorových buněk, v některých případech může korelovat se stupněm nádoru. Jeho zvýšená exprese značí horší prognózu onemocnění. (Hardy et al., 2016; Tampaki et al., 2014) V současnosti probíhá intenzivní studium role nestinu jako markeru nádorových kmenových buněk. (Neradil & Veselska, 2015)

3.4 Imunohistochemie

Jedná se o imunohistologickou metodu, která využívá interakce antigenu a protilátky. Kombinuje principy imunologie a histochemie. Antigen je cizorodá částice, kterou protilátka rozpoznává a reaguje na něj. Nejčastěji se jedná o proteiny, glykoproteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny a lipoproteiny. Antigeny mají schopnost vyvolat tvorbu protilátek a zároveň reagují specificky, což znamená, že mohou reagovat pouze se specifickou kompatibilní protilátkou. Protilátky jsou látky bílkovinné povahy, konkrétně se jedná o imunoglobuliny, které řadíme do několika tříd. Protilátky mohou být monoklonální, nebo polyklonální. Monoklonální protilátky získáváme z jednoho klonu plazmatických B-buněk, vytváří se homogenní populace specifických protilátek s přesně definovanými a stejnými vlastnostmi a specifickou vazbou na substrát. Polyklonální protilátky vznikají z různých klonů plazmatických buněk. Dochází k produkci heterogenních protilátek proti určitému antigenu, tyto protilátky interagují s různými

epitopy na témže antigenu.(Anthony L. Mescher, 2018; Jílek, 2014; Maňáková & Seichertová, b.r.)

3.4.1 Imunohistochemické metody

Imunohistochemické metody se využívají pro detekci antigenu ve tkáních, následná pozitivita reakce je vyznačena barevnou reakcí. V laboratorní praxi jsou imunohistochemické metody stále velmi používané. (Hajzlerová, 2014; Maňáková & Seichertová, b.r.)

Pro značení protilátek se používají různé markery, což umožňuje detekci v biologickém materiálu. Z tohoto hlediska můžeme imunohistochemii rozdělit na enzymatickou a fluorescenční část. Enzymatická imunohistochemie využívá značení pomocí enzymů. Nejznámější enzym pro značení protilátek je křenová peroxidáza (HRP, horseradish peroxidase). Při použití enzymu pro označení protilátek je třeba reakci lokalizovat substrátem, aby mohla proběhnout barevná změna, a to např. 3,3'-diaminobenzidinem tetrachloridu (DAB). (Hajzlerová, 2014)

Pro fluorescenční imunohistochemii se využívá značení pomocí fluorochromů (FITC, Cyanin 3,2, Alexa Fluor). (Anthony L. Mescher, 2018; Hajzlerová, 2014; Maňáková & Seichertová, b.r.)

Protilátky se mohou vázat buď přímou, nebo nepřímou reakcí z čehož vychází metody přímé a nepřímé. Metody nepřímé se dělí na dvojstupňové a trojstupňové. (Maňáková & Seichertová, b.r.)

3.4.2 LSAB metoda

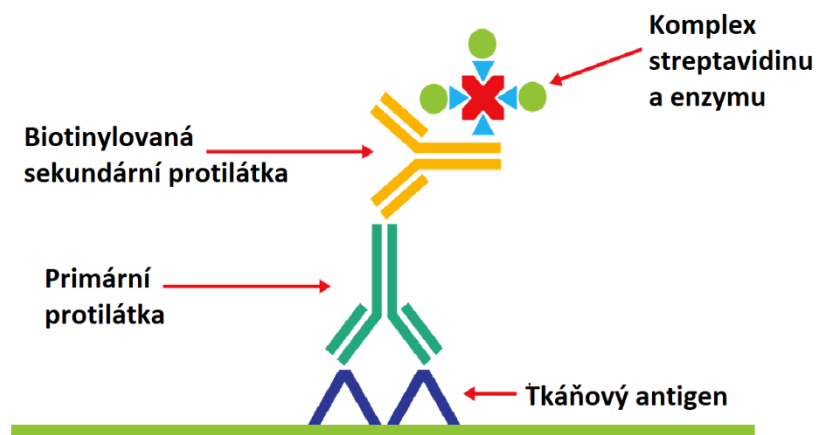
LSAB (labeled streptavidin biotin) je založena na interakci mezi streptavidinem a biotinem. Řadí se mezi nepřímé trojstupňové metody. (Hajzlerová, 2014; Key, 2006)

Biotin je vitamin B7 neboli vitamin H, patří mezi ve vodě rozpustné vitamíny. V lidském organismu má mnoho biologických funkcí, jako např. zapojení do chromatinové struktury, hraje roli i v regulaci genové exprese. Dále slouží jako koenzym pro karboxylázy. (Hajzlerová, 2014; Zemleni et al., 2009)

Streptavidin je protein izolovaný z mikroorganismu *Streptomyces avidini* s vysokou afinitou k biotinu. Obsahuje 4 vazebná místa pro biotin. Molekula biotinu je jednoduše konjugována na protilátky a enzymy. Použití streptavidinu místo avidinu je výhodou při snaze o snížení pozadí při barvení a amplifikaci signálu, ovšem nevýhodou je menší stabilita komplexu a nižší afinita k biotinu oproti avidinu. Přesto je však streptavidin v laboratořích hojně využíván. (Hajzlerová, 2014; Key, 2006)

Streptavidin může být označen křenovou peroxidázou, která se získává z kořene křenu selského (*Armoracia rusticana*). Křenová peroxidáza využívá peroxid vodíku k oxidaci chromogenu, který poté mění barvu a detekuje tak reakci. Další možností je označení streptavidinu (avidinu) fluorescenčním barvivem Cy3. (Hajzlerová, 2014; Hsu et al., 1981)

V této metodě je využito dvou protilátek. Neznačená primární protilátka se naváže na antigen ve tkáni. Na primární protilátku je v dalším kroku navázaná biotinylovaná sekundární protilátka. Na sekundární protilátku se váže komplex streptavidinu a konjugovaného enzymatického markeru (Obrázek XII) nebo fluorochromu. Díky vysokému poměru enzymu či fluorochromu a protilátek je výrazně zvýšená senzitivita oproti přímým metodám. Pro zviditelnění positivity reakce se využívá substrát, který enzym přemění na barevná produkt. Nejběžnějším chromogenem je DAB, jehož výsledkem je hnědé zbarvení. Při použití fluorescenční detekce není potřeba používat chromogenní substráty pro zvýraznění reakce. (Hajzlerová, 2014; Key, 2006)

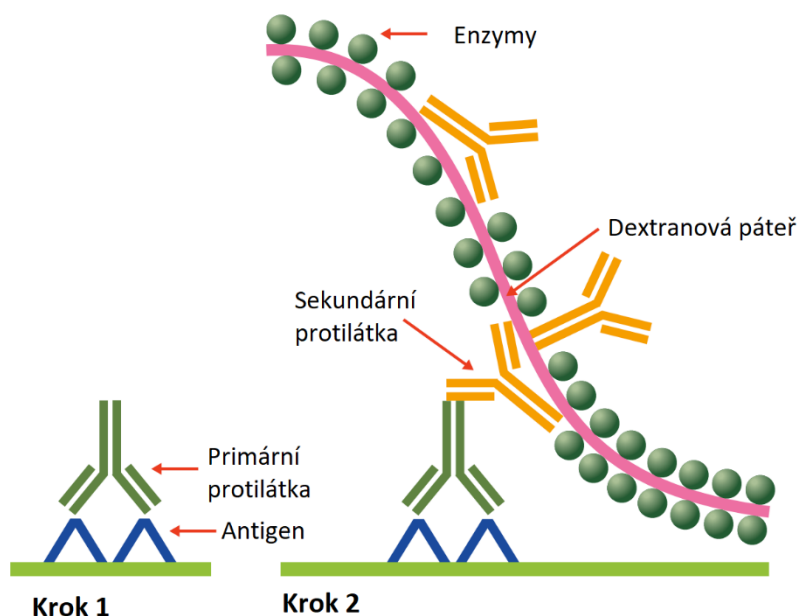


Obrázek XII Schéma LSAB metody, upraveno dle: (Key, 2006)

3.4.3 Metoda EnVision Flex kit

EnVision metoda se řadí mezi metody využívající technologii na bázi polymerů (dextranový řetězec). Na dextranové páteři je navázáno množství sekundárních protilátek proti primárním králičím nebo myším primárním protilátkám a molekul enzymů (Obrázek XIII). Tato metoda je velmi citlivá a v laboratořích často využívána. Je jednoduchá a rychlá a eliminuje nespecifické výsledky barvení, jelikož neobsahuje biologické molekuly s endogenní aktivitou. Umožňuje detekci malého množství antigenu. Nevýhodou metody je velikost dextranové molekuly, která nedokáže proniknout skrz membrány a také sterické bránění, které omezuje vazbu na epitopy. Tuto nevýhodu lze odstranit použitím pufru s obsahem detergentu (např. Tween 20, Triton X). (Hajzlerová, 2014; Key, 2006)

Jedná se o nepřímou imunohistochemickou metodu, která se skládá ze dvou kroků. Nejprve je na antigen navázána nekonjugovaná myší nebo králičí primární protilátka, poté je přidán polymer se sekundárními protilátkami a enzymy. Chromogenem pro detekci reakce je opět nejčastěji DAB. (Hajzlerová, 2014; Key, 2006)



Obrázek XIII Schéma metody EnVision, upraveno dle: (Key, 2006)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Návrh experimentu

V této bakalářské práci jsem se zaměřila na detekci nestinu při vývoji kosterní svaloviny za použití 14denního myšního embrya a na regeneraci kosterního svalu při poranění injekcí kardiotoxinu za použití *musculus tibialis cranialis* u dospělé myši. Kardiotoxin se aplikoval injekcí 75 μ l roztoku (100 μ l kardiotoxinu a 900 μ l sterilního fyziologického roztoku) do svalu. Vzorky byly odebrány 2 dny, 4 dny a 8 dní po poranění. Laboratorní myši byly geneticky upravené, jednalo se o NMRI myši.

Během regenerace i vývoje dochází k tvorbě nových svalových vláken, proto jsme předpokládali, že zde bude docházet k expresi nestinu, a to zejména v myotubách a myoblastech.

Vyšetřované vzorky tkání byly z laboratorních myší odebrány, zpracovány a zality do parafínových bločků pracovníky Ústavu Histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Sama jsem parafínové bloky krájela na mikrotomu a dále prováděla detekci imunohistochemickými metodami, základní barvení a montování obarvených preparátů.

Pro základní orientaci v kosterní svalové tkáni u dospělé myši i embrya bylo použito histologické barvení hematoxylin-eosin (HE).

Pro imunohistochemickou detekci nestinu byla použita metoda LSAB, což je trojstupňová nepřímá metoda. Jako enzym pro značení streptavidinu byla použita křenová peroxidáza (HRP). Chromogenem pro detekci reakce byl DAB. U fluorescence byl použit fluorochrom Cy3.

Jako druhou imunohistochemickou metodu jsme použili metodu EnVision Flex kit, což je nepřímá dvojstupňová metoda na bázi polymeru. Enzymem navázaným na dextranové páteři byla křenová peroxidáza a chromogenem opět DAB.

4.2 Příprava roztoků

Mayerův hematoxylin

1 g hematoxylinu (LOBA Feinchemie, Rakousko), 0,2 g NaIO₃, 50 g AlK (SO₄)₂ (kamenec draselný), 1 g kyseliny citronové, 50 g chloralhydrátu, 1000 ml redestilované vody

Chloralhydrát a kyselina citronová se přidávají až po rozpuštění předcházejících látek

PBS (phosphate buffered saline) pufr

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 7,16 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 1000 ml redestilované vody

Citrátový pufr

9 ml roztoku kyseliny citronové (kyselina citronová 21,02 g, redestilovaná voda 1000 ml),
41 ml roztoku citronanu sodného (citronan sodný 29,41 g, redestilovaná voda 1000 ml),
450 ml redestilované vody

DAB (3,3'-diaminobenzidin)

10 mg práškového DAB (Merck, Německo), 3-4 kapky N,N-Dimethylformamidu, 10 ml PBS, 5 µl H₂O₂

Roztok pro utlumení peroxidázy

5 ml H₂O₂, 25 ml redestilované vody

Roztok pro permeabilizaci

2,5 ml Triton X (Merck, Německo), 500 ml redestilované vody

4.3 Hematoxylin-eosin

Před barvením bylo provedeno odparafínování řezů. K tomu byly použity místo etanolu a xylenu přípravky Ottix Plus a Ottix Shaper (DiaPath, Itálie), které nejsou pro pracovníky toxické. Jedná se o směsi alifatických alkoholů a směs lineárních nearomatických uhlovodíků.

Poté byly řezy obarveny Mayerovým hematoxylinem pro zvýraznění jader, následně byly opláchnuty pod tekoucí vodou. Po oplachu byly řezy obarveny eosinem Y (1% roztok; Carl Roth, Rakousko), pro zvýraznění cytoplazmy. Následoval další oplach a provedlo se odvodnění opět pomocí Ottix Shaper a Ottix Plus. Nakonec byly řezy zamontovány do montovacího média DPX (Merck, Německo).

Pracovní postup (LF HK, Ústav histologie a embryologie, 2023)

1. Odparafínování – Ottix Plus	7 minut
2. Odparafínování – Ottix Plus	7 minut
3. Odparafínování – Ottix Shaper	3 minuty
4. Odparafínování – Ottix Shaper	3 minuty
5. Oplach destilovanou vodou	3 minuty
6. Barvení jader – hematoxylin	5 minut
7. Oplach tekoucí vodou	10 minut
8. Barvení cytoplazmy – vodný roztok eosinu	5 minut
9. Oplach destilovanou vodou	5 minut
10. Odvodnění – Ottix Shaper	2 minuty
11. Odvodnění – Ottix Shaper	1 minuta
12. Odvodnění – Ottix Plus	5 minut
13. Odvodnění – Ottix Plus	5 minut
14. Montování řezů do DPX	

4.4 Imunohistochemická detekce

Použité primární protilátky

Králičí monoklonální protilátka anti-nestin (EPR22023); ředění 1:1000; Abcam, Velká Británie

Potkaní monoklonální protilátka anti-nestin (7A3); ředění 1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA

Použité sekundární protilátky

Oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-králičí; ředění 1:250; Jackson IR, USA

Oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-potkaní, ředění 1:250; Jackson IR, USA

Antigen retrieval

Po fixaci 4% formaldehydem dochází ke změně konformace proteinů a tím deformaci epitopů antigenu. Pro renaturaci a obnovu schopnosti antigenu vázat protilátku se používá metoda odmaskování antigenu (antigen retrieval), což vede ke zvýšení citlivosti detekce.

Nejprve se provede odparafínování a odvodnění řezů pomocí Ottix shaper a Ottix plus. Následně se řezy ponoří do citrátového pufru a jsou vystaveny vysoké teplotě a mikrovlnám v přístroji KOS histomodule (Milestone medical, Itálie), kde je po dobu 15 minut udržována konstantní teplota 98 °C. Celý proces v přístroji trvá 27 minut, kdy prvních 12 minut se přístroj zahřívá. Řezy jsou ponechány v citrátovém pufru, dokud nevychladnou, poté se přechází k imunohistochemické detekci.

4.4.1 LSAB-HRP

Po revitalizaci epitopů se řezy opláchny destilovanou vodou, poté se pro usnadnění prostoupení membrán protilátkami provede permeabilizace. Řezy se propláchny 3% H₂O₂ pro utlumení aktivity endogenní peroxidázy. Následoval oplach v PBS a aplikace oslího séra (Jackson IR, USA, ředění 1:20), aby se zablokovala nespecifická vazebná místa. Po 20 minutách byly aplikovány primární protilátky, každá zvlášť na jiný řez, a nechaly se inkubovat 60 minut. Poté se řezy opláchny v PBS a následovala aplikace

biotinylovaných sekundárních protilátek na 45 minut. Sekundární anti-potkaní protilátka se aplikovala na primární potkaní protilátku a anti-králičí na králičí protilátku. Po oplachu v PBS se aplikoval streptavidin označený enzymem HRP (Agilent, USA). Po dalším oplachu v PBS se pro vizualizaci použil roztok DAB. Reakce HRP a DAB se sledovala pod mikroskopem a byla zastavena ponořením řezů do destilované vody, aby nedošlo k přebarvení preparátů. Poté byly řezy opláchnuty v roztoku modré skalice pro odstranění pozadí, a pro zvýraznění jader byl použit Mayerův hematoxylin. Po modrání pod tekoucí vodou byly řezy odvodněny a zamontovány.

1. Odparafínování a zavodnění	10 minut
2. Antigen retrieval	27 minut
3. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
4. Permeabilizace	10 min
5. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
6. Utlumení endogenní peroxidázy	3x10 minut
7. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
8. Oplach v PBS	3x5 minut
9. Oslí sérum	20 minut
10. Primární protilátky	60 minut
a. Králičí monoklonální protilátka anti-nestin	
b. Potkaní monoklonální protilátka anti-nestin	
11. Oplach v PBS	3x5 minut
12. Sekundární biotinylované protilátky	45 minut
a. Oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-králičí; ředění 1:250	
b. Oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-potkaní; ředění 1:250	
13. Oplach v PBS	3x5 minut
14. Streptavidin-HRP	45 minut
15. Oplach v PBS	3x5 minut
16. DAB	1-5 minut
17. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
18. Oplach v 2% CuSO ₄	5 minut
19. Oplach destilovanou vodou	2 minuty

20. Mayerův hematoxylin	20 sekund
21. Oplach pod tekoucí vodou	10 minut
22. Odvodnění – Ottix shaper	2 minuty
23. Odvodnění – Ottix shaper	5 minut
24. Odvodnění – Ottix plus	5 minut
25. Odvodnění – Ottix plus	5 minut
26. Montování do DPX	

4.4.2 LSAB – Cy3

Po odparafínování a revitalizaci epitopů byla provedena permeabilizace a utlumení aktivity endogenní peroxidázy pomocí roztoku H₂O₂. Následně bylo aplikováno oslí sérum a primární králičí anti-nestin protilátka, která byla na řezech inkubována přes noc ve vlhké komůrce. Poté se řezy opláchly v pufru a aplikovala se sekundární oslí anti-králičí protilátka a po dalším oplachu v pufru streptavidin značený fluorescenčním barvivem Cy3 (Merck, Německo). Řezy byly s fluorescenčními barvivy uchovávány ve tmě, aby nedošlo k jejich vysvícení. Poté byl proveden oplach destilovanou vodou a pro zvýraznění jader bylo použito fluorescenční barvivo DAPI (diaminophenylindol) (Merck, Německo). Nakonec byly řezy zamontovány do speciálního média Fluorescence mounting medium (Agilent, USA).

1. Odparafínování a zavodnění	10 minut
2. Antigen retrieval	27 minut
3. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
4. Permeabilizace	10 min
5. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
6. Utlumení peroxidázy	3x10 minut
7. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
8. Oplach v PBS	3x5 minut
9. Oslí sérum	20 minut
10. Králičí monoklonální protilátka anti-nestin	přes noc
11. Oplach v PBS	3x5 minut

12. Oslí sekundární biotinylovaná protilátka anti-králičí	45 minut
13. Oplach v PBS	3x5 minut
14. Streptavidin-Cy3 (ředění 1:300)	45 minut
15. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
16. DAPI	5 minut
17. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
18. Montování do speciálního média pro fluorescenci	

4.4.3 EnVision Flex kit-HRP

Po revitalizaci epitopů se řezy opláchly destilovanou vodou, poté byla provedena permeabilizace a řezy se opláchnou destilovanou vodou. Pro utlumení endogenní peroxidázy byly použity reagenty dodávané v kitu. Následoval oplach v destilované vodě a pufru, který je rovněž součástí kitu, před použitím se ředí 1:20 destilovanou vodou. Inkubace s králičí monoklonální protilátkou byla provedena přes noc. Poté byly řezy opět promyty dodávaným pufrem a byl aplikován detekční roztok s polymerem s navázanými sekundárními protilátkami, který je označen enzymem HRP. Detekční roztok je také součástí kitu. Pro vizualizaci reakce byl použit roztok DAB, proces byl opět sledován pod mikroskopem, aby nedošlo k přebarvení. Následoval oplach v destilované vodě a v modré skalici, dobarvení jader Mayerovým hematoxylinem, modrání, odvodnění a montování do DPX.

1. Odparafínování a zavodnění	10 minut
2. Antigen retrieval	27 minut
3. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
4. Permeabilizace	10 min
5. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
6. EnVision Flex peroxidase blocking reagent	3x10 minut
7. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
8. Oplach v pufru (wash buffer, ředění 1:20)	3x5 minut
9. Králičí monoklonální protilátka anti-nestin	přes noc
10. Wash buffer, ředění 1:20	3x5 minut

11. Detekční roztok EnVision Flex polymer HRP	30 minut
12. Wash buffer, ředění 1:20	3x5 minut
13. DAB	1-5 minut
14. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
15. Oplach CuSO ₄	5 minut
16. Oplach destilovanou vodou	2 minuty
17. Mayerův hematoxylin	20 sekund
18. Oplach pod tekoucí vodou	10 minut
19. Odvodnění – Ottix shaper	2 minuty
20. Odvodnění – Ottix shaper	5 minut
21. Odvodnění – Ottix plus	5 minut
22. Odvodnění – Ottix plus	5 minut
23. Montování do DPX	

5. VÝSLEDKY

5.1 Vyhodnocení snímků

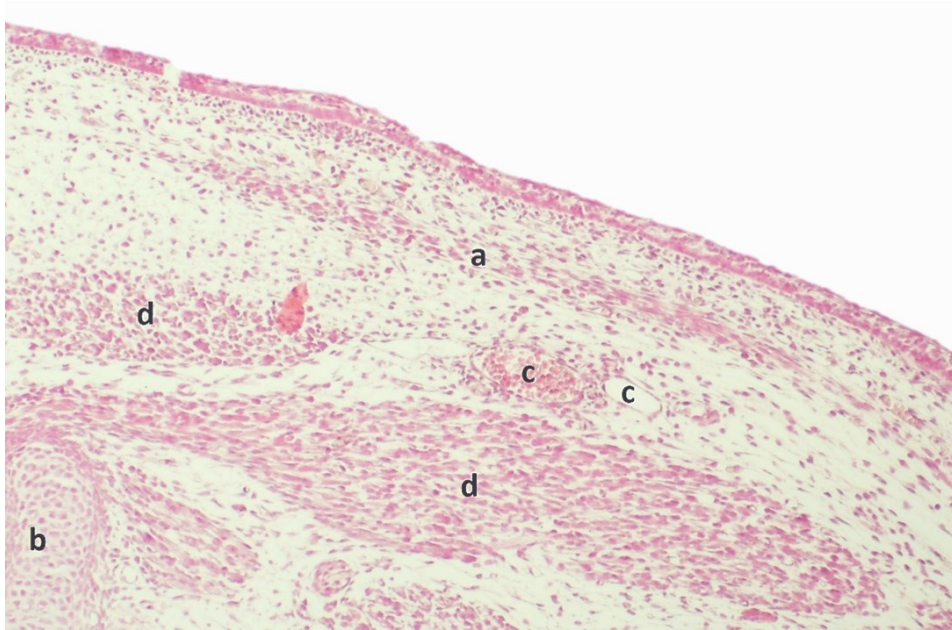
5.1.1 Embryo

Ve 14denním myším embryu vykazovala silnou imunoreaktivitu na nestin veškerá tvořící se kosterní svalovina (Obrázek XIV, Obrázek XV). Expresi nestinu jsme zachytili v hlubokých svalech, ve svalové tkáni v podkoží – *panniculus carnosus*, a také ve svalové tkáni v okolí *nervus opticus* a očí a v nervu samotném. Tvořící se kosterní svalovina se v tomto stádiu vývoje embrya skládala především z myotoub, jejichž cytoplazma je nestin-pozitivní. Myotuby jsou prekurzorové buňky kosterní svaloviny, tudíž vykazují silnou imunopozitivitu. V myotubách se jádra nacházela uprostřed buněk, což značí, že buňky kosterní svaloviny ještě neprošly závěrečnou diferenciací, kdy jsou jádra utlačena na periferii myofibrilami. (Carlson, 2018)

Další tkání pozitivní na nestin byly krevní cévy a nervová tkáň, které do kosterní svaloviny prorůstají krátce po vývoji prvních myotub. (Carlson, 2018)

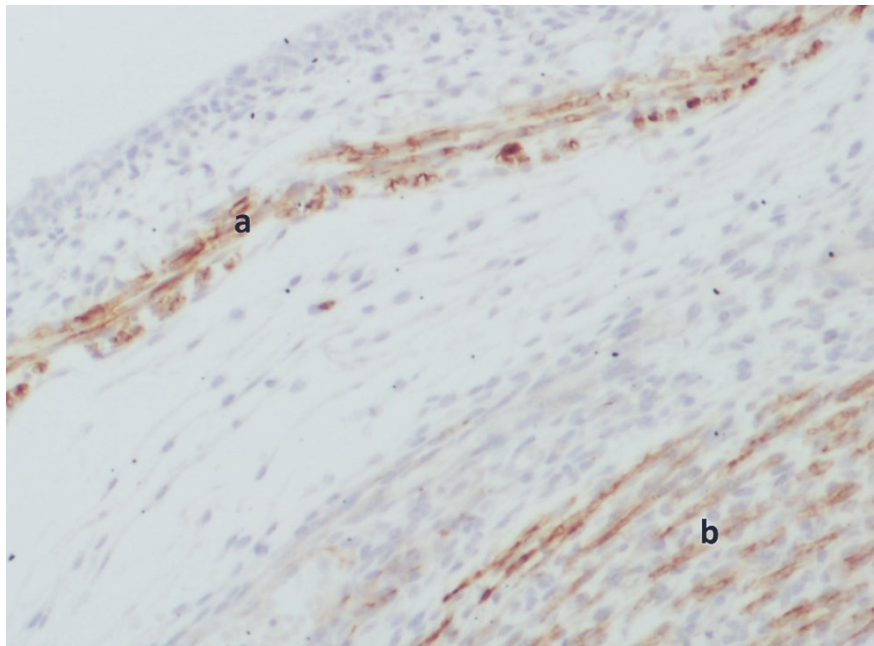
Pro průkaz nestinu v embryonální tkáni jsme použili pouze metodu EnVision.

Řezy embrya jsme obarvili i metodou hematoxylin-eosin pro morfologický popis svalové, pojivové a nervové tkáně a krevních cév (Obrázek XIII).



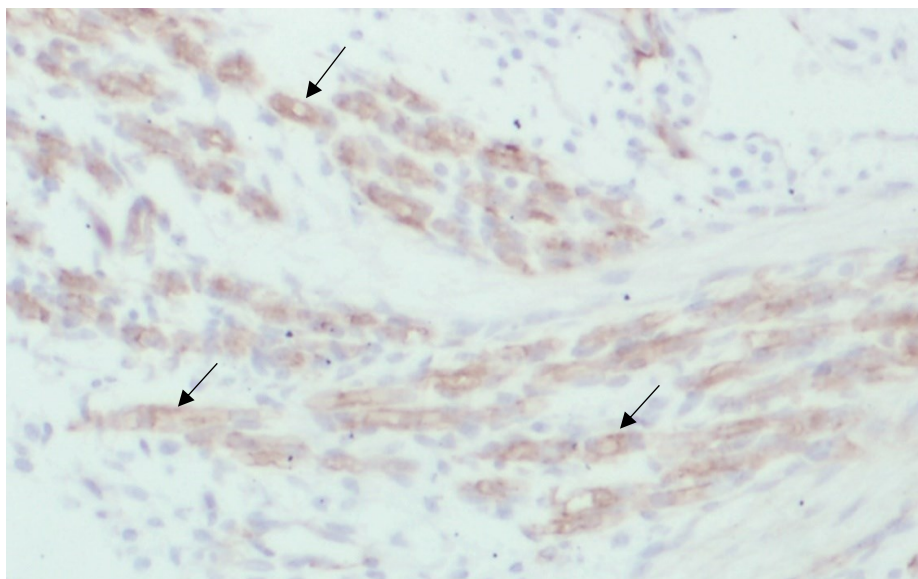
Obrázek XIII Řez embrya, barvení HE, zvětšení 100x

V podkoží můžeme nalézt svalovou tkáň zvanou *panniculus carnosus* (a), dále se zde nachází tvořící se kost (b), cévy (c) a vytvářející se kosterní svalovina (d).



Obrázek XIV Řez embrya, metoda EnVision, zvětšení 200x

Nestin-pozitivní je svalová tkáň *panniculus carnosus* (a) a také tvořící se kosterní svalovina, kde můžeme vidět myotuby (b).



Obrázek XV Řez embrya – myotuby, metoda EnVision, zvětšení 200x

Nestin-pozitivní cytoplazma myotub (šipky) ve vyvíjejícím se svalu.

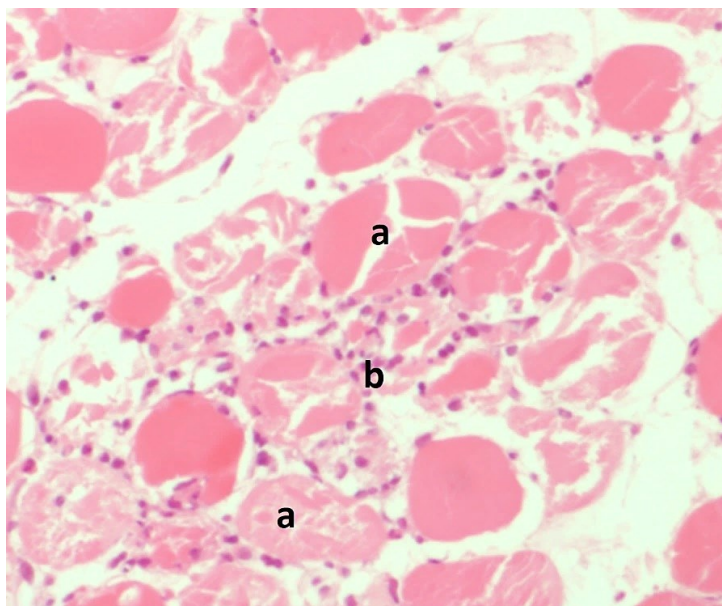
5.1.2 Kosterní sval 2 dny po poranění

2 dny po poranění svalu injekcí kardiotoxinu byl ve tkáni přítomen výrazný zánět (Obrázek XVI), což je známkou první fáze regenerace. Tkáň infiltrují neutrofilní granulocyty a monocyty, které se ve tkáni mění na makrofágy. Tyto bílé krvinky svými působky stimulují proliferaci a diferenciaci svalových buněk. (Čížková, 2019)

Rovněž můžeme ve tkáni pozorovat silně imunoreaktivní myoblasty (Obrázek XVII-XIX), což jsou prekurzorové buňky kosterní svaloviny, které mají vřetenovitý tvar a jedno jádro. Myoblasty vznikají ve druhé fázi regenerace – tzv. fázi aktivace, kdy satelitové buňky vstupují do buněčného cyklu a migrují do poraněné tkáně. Zde mohou fúzovat s poraněnými svalovými vlákny, nebo se z nich tvoří myoblasty. (Čížková, 2019)

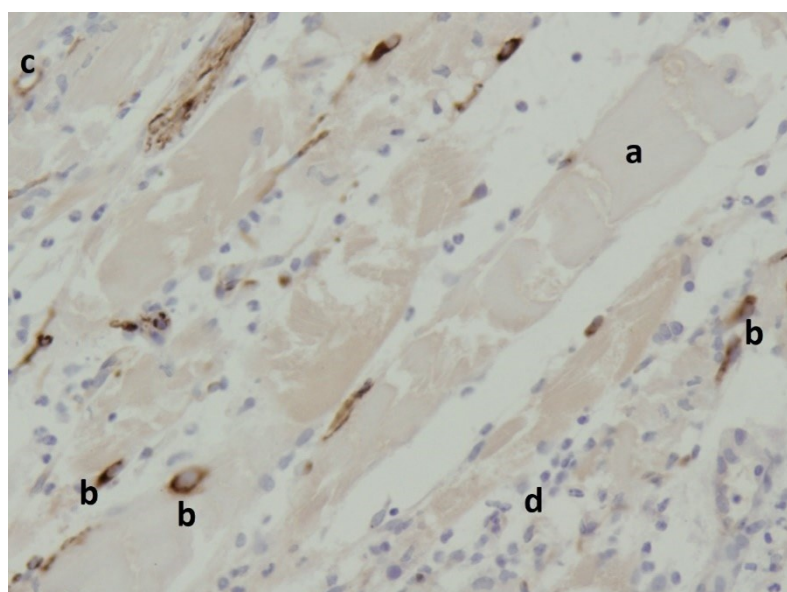
Nachází se zde velké množství rozpadlých svalových vláken, což je důsledek působení kardiotoxinu (Obrázek XVIII-XIX).

Dochází zde k tvorbě nových krevních cév neboli k revaskularizaci tkáně. Nově tvořené krevní cévy jsou nestin-pozitivní.



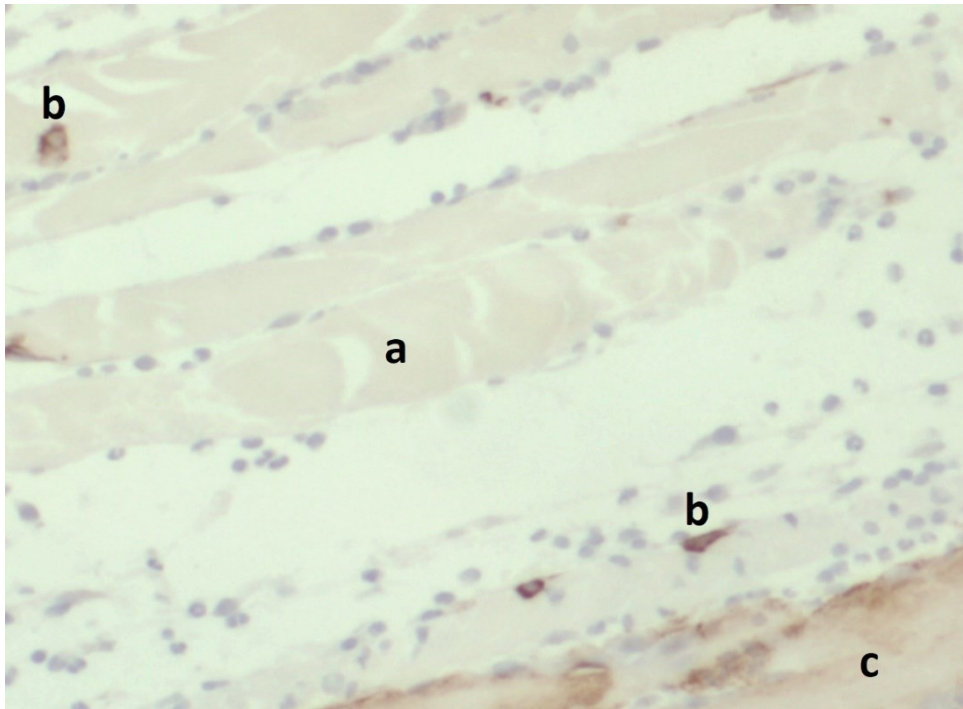
Obrázek XVI Řez svalem 2 dny po poranění, barvení HE, zvětšení 200x

Svalová vlákna se po dvou dnech od poranění injekcí kardiotoxinu rozpadají (a), ve tkáni se rozvíjí zánět (b).

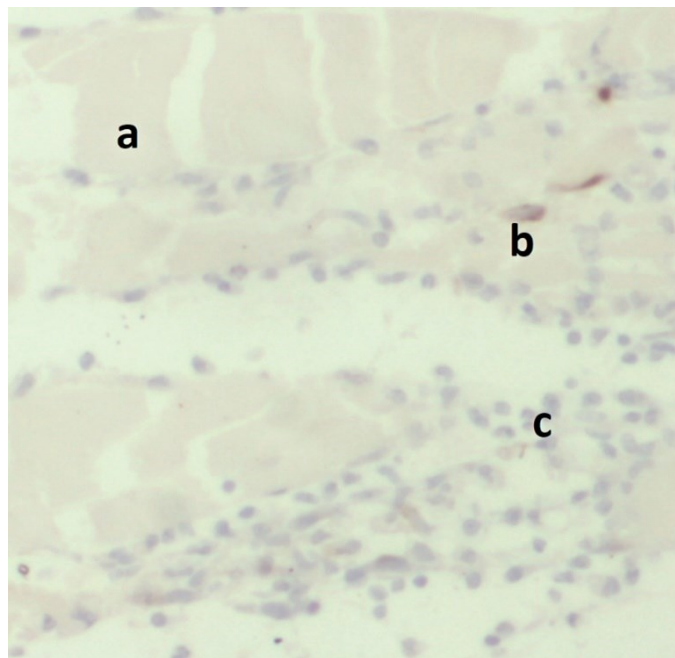


Obrázek XVII Řez svalem 2 dny po poranění, metoda EnVision-HRP, zvětšení 200x

Kosterní svalovina se rozpadá (a) a do tkáně putují myoblasty (b), které jsou silně nestin-pozitivní. Probíhá tvorba krevních cév (c), které jsou rovněž nestin-pozitivní. Ve tkáni se rozvíjí zánět (d).



Obrázek XVIII Řez svalem 2 dny po poranění, LSAB-HRP, králičí protilátka, zvětšení 200x
 Vlákna kosterní svaloviny se rozpadají (a), do tkáně putují myoblasty (b), můžeme zde vidět i nespecifickou reakci v oblasti degenerace svalových vláken (c).

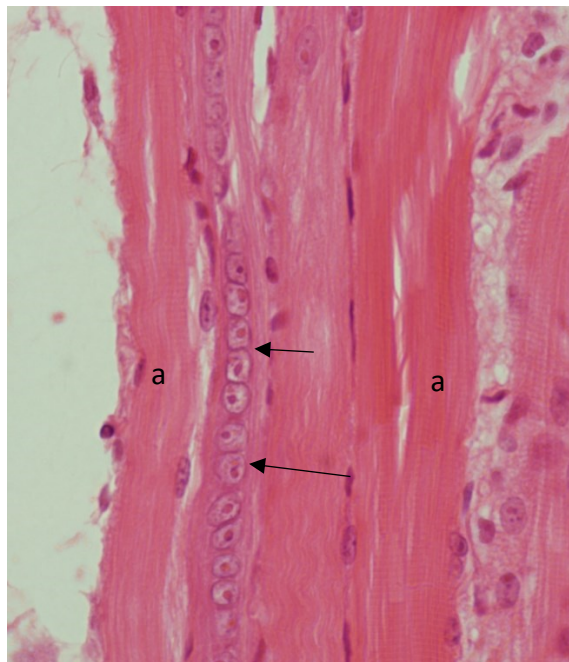


Obrázek XIX Řez svalem 2 dny po poranění, LSAB-HRP, potkaní protilátka, zvětšení 200x
 Na řezu vidíme rozpadající se svalovou tkáň (a), myoblast (b) a probíhající zánět (c).

5.1.3 Kosterní sval 4 dny po poranění

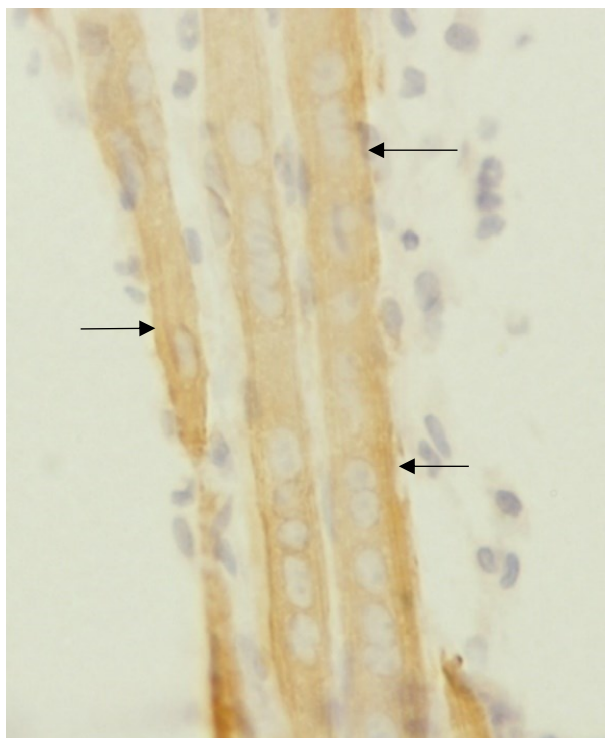
V kosterní svalovině 4 dny po poranění dochází k fúzi myoblastů za vzniku myotub a vznikají tak nová svalová vlákna, což je známkou třetí fáze procesu regenerace (Obrázek XX-XXIII). Nachází se zde i již zregenerovaná svalová tkáň, která nevykazuje pozitivitu na nestin, jelikož při vyžívání kosterní svaloviny je nestin nahrazen jiným IF.

Řez kosterní svaloviny v tomto stádiu regenerace byl jediným reprezentativním vzorkem pro metodu LSAB-Cy3, kdy jsme prováděli imunofluorescenční detekci nestinu (Obrázek XXIV). Podařilo se nám zachytit silně imunoreaktivní cytoplazmu myotub, která je znázorněna červeným fluorescenčním barvivem Cy3. Jádra byla dobarvena fluorescenčním barvivem DAPI a mají modrou barvu. Nestin-pozitivní tkáň je zde pouze cytoplazma myotub, což značí, že v pozdějších stádiích vyžívání kosterní svaloviny se již nestin nevyskytuje.

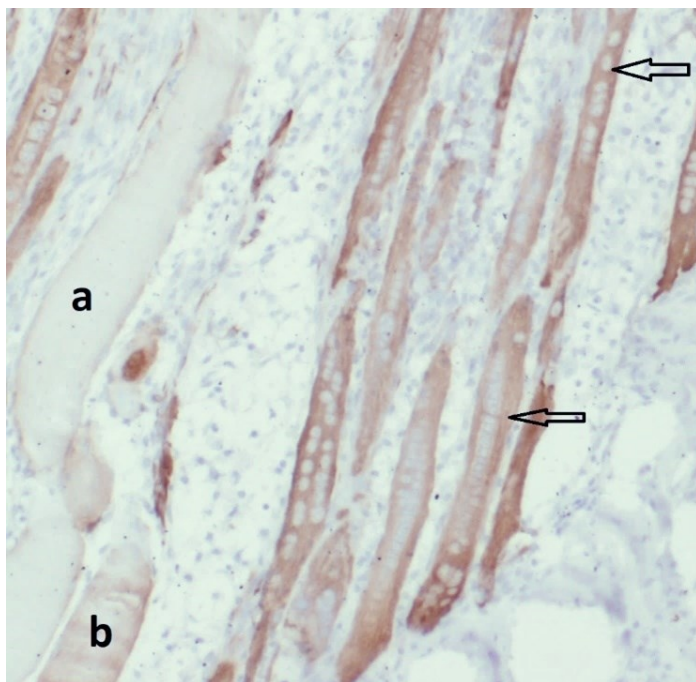


Obrázek XX Řez svaľem 4 dny po poranění, barvení HE, zvětšení 400x

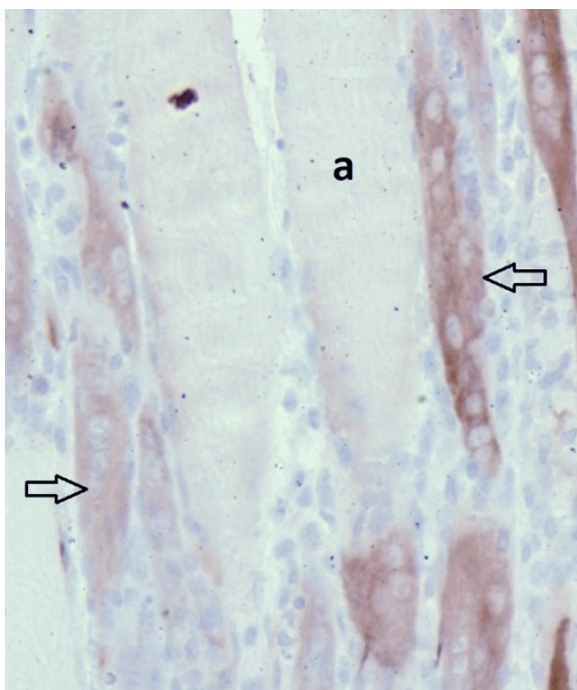
4 dny po poranění dochází ve svalu k vytváření nových svalových vláken, která vznikají z myotub (šipka). Dále zde můžeme vidět intaktní svalová vlákna, která mají jádra na periferii a je zde viditelné příčné žíhání (a).



Obrázek XXI Řez svalem 4 dny po poranění, metoda EnVision-HRP, zvětšení 400x
Nestin-pozitivní myotuby (šipka) formující nová svalová vlákna.

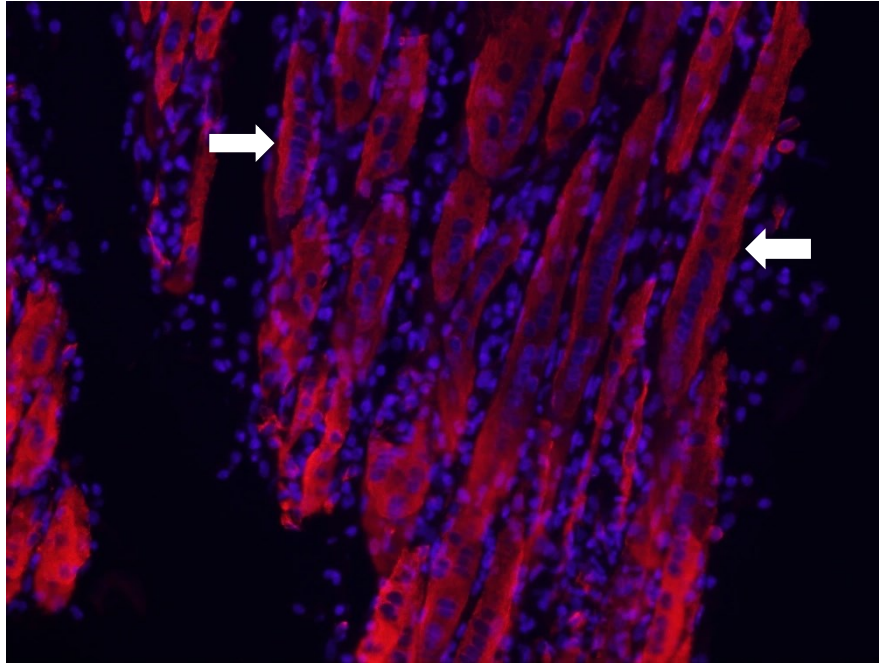


Obrázek XXII Řez svalem 4 dny po poranění, LSAB-HRP, králičí protilátka, zvětšení 100x
 4 dny po poranění můžeme pozorovat myotuby (šipky), intaktní svalová vlákna (a), a také poškozená svalová vlákna (b), která reagují nespecificky, nestin se zde nenachází.



Obrázek XXIII Řez svalem 4 dny po poranění, LSAB-HRP, potkaní protilátka, zvětšení 200x

Zde můžeme vidět myotuby (šipka) a intaktní svalová vlákna (a), která nevykazují pozitivitu na nestin.



Obrázek XXIV Řez svalem 4 dny po poranění, metoda LSAB-Cy3, zvětšení 200x

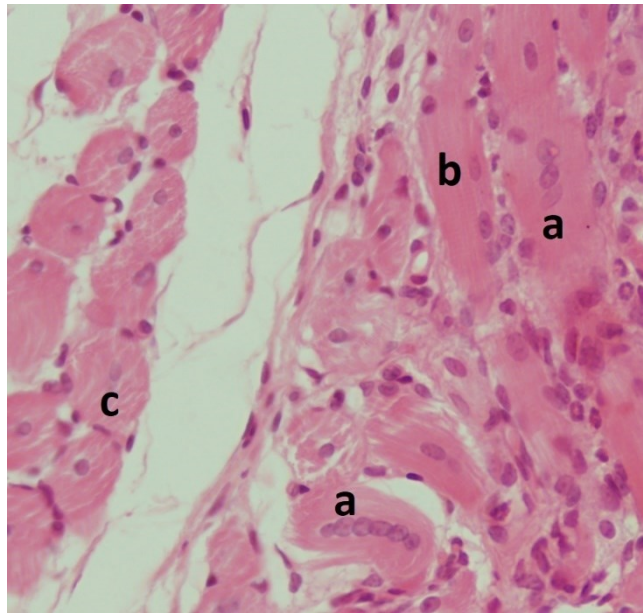
Na řezu můžeme vidět velké množství myotub (šipky). Červenou barvou je znázorněna nestin-positivní tkáň, na kterou je navázáno pomocí LSAB metody fluorescenční barvivo Cy3. Jádra buněk jsou dobarvena fluorescenčním barvivem DAPI. Obrázek je výsledkem proložení dvou samostatných fotek s barvivem Cy3 a s barvivem DAPI pomocí programu Adobe Photoshop.

5.1.4 Kosterní sval 8 dní po poranění

Na řezech tkání 8 dní po poranění nalezneme jak plně zregenerovaná svalová vlákna s jádry nacházejícími se na periferii a viditelným žíháním, tak poškozená svalová vlákna (Obrázek XXV). To značí, že poškození kardiotoxinem a následná regenerace neprobíhají ve tkáni rovnoměrně.

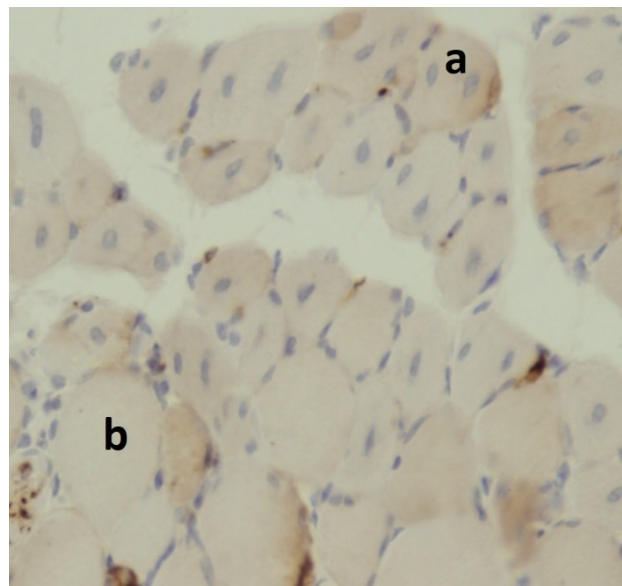
Dále se zde nachází myotuby a malé množství myoblastů. Některá svalová vlákna jsou tedy již plně zregenerovaná, některá se nachází v různých fázích regenerace a některá jsou stále ještě poškozená (Obrázek XXVI-XXVIII).

Ve tkáni dochází k výrazné revaskularizaci (Obrázek XXVII).



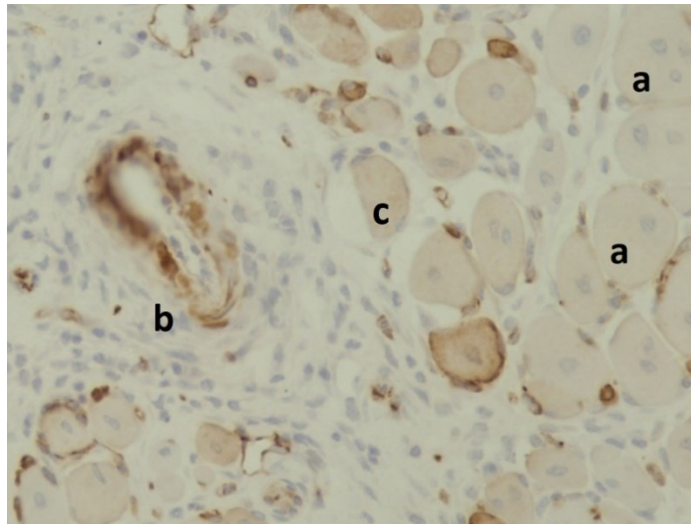
Obrázek XXV Řez svalem 8 dní po poranění, barvení HE, zvětšení 200x

8 dní po poranění můžeme ve svalové tkáni najít jak nově se tvořící svalová vlákna z myotub (a), tak zregenerovaná vlákna (b). Dále se zde nacházejí i rozpadlá svalová vlákna (c)

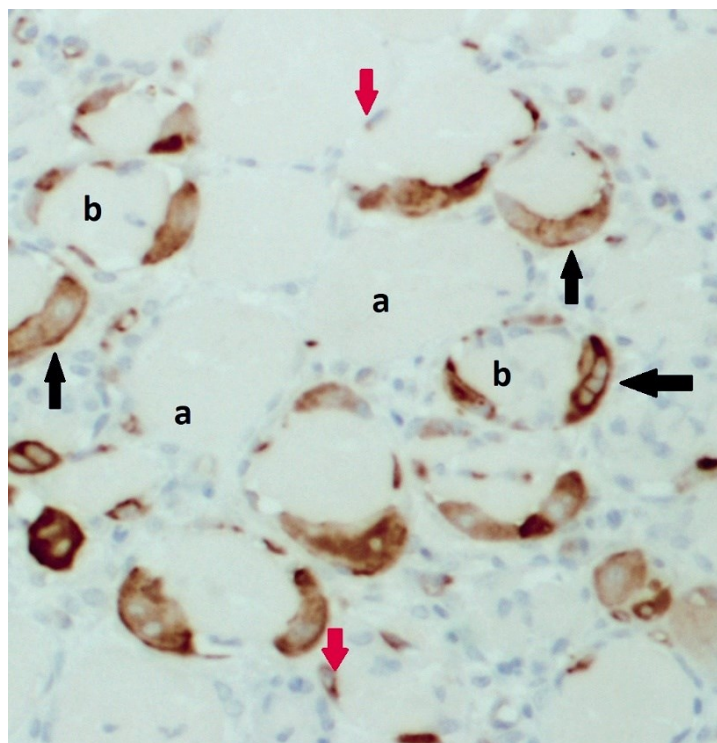


Obrázek XXVI Řez svalem 8 dní po poranění, metoda EnVision-HRP, zvětšení 200x

Zde můžeme vidět vyzávající svalová vlákna (a) s jádry uprostřed buněk migrujícími k periferii, a také zregenerovaná zralá svalová vlákna s jádry na periferii (b). Pozitivita na nestin již není tak výrazná.



Obrázek XXVII Řez svalem 8 dní po poranění, LSAB-HRP, králičí protilátka, zvětšení 200x
 Můžeme zde vidět vyzárající svalová vlákna (a) s jádry, která se nachází uprostřed a migrují na periferii buněk. Dále se zde nachází nově se tvořící cévní zásobení svalu (b), a také zralá svalová vlákna (c).



Obrázek XXVIII Řez svalem 8 dní po poranění, LSAB-HRP, potkaní protilátka, zvětšení 200x

Můžeme vidět poškozenou svalovou tkáň (a), vyzárající svalová vlákna (b), myotuby (černá šipka) a myoblasty (červená šipka).

6. DISKUSE

Nestin je obecně považován za marker kmenových a progenitorových buněk, a to zejména v CNS. Hraje důležitou roli při jejich migraci a diferenciaci. Nestin rovněž produkuje prekursorové buňky svalové tkáně. (Čížková, 2019) V průběhu embryogeneze dochází k jeho expresi při migraci a proliferaci buněk a postupně je nahrazen jiným proteinem ze skupiny intermediárních filament, ve svalové tkáni je tímto proteinem desmin. (Vařejčková, 2012) Nestin lze také detekovat při regeneraci a revaskularizaci tkání, kdy dochází k opakování vývojových procesů, což vyvolává expresi nestinu progenitorovými buňkami. (Čížková, 2019; Hardy et al., 2016; Tampaki et al., 2014)

Vaittinen et al. studovali expresi nestinu spolu s dalšími intermediárními filamenty v průběhu regenerace kosterního svalu. Dospěli k závěru, že jejich exprese je dynamická a velmi specifická, průběh exprese připomíná embryonální vývoj kosterní svaloviny. Exprese nestinu je ve svalové tkáni spojena se zahájením reparace tkáně a postupně klesá v průběhu remodelace, kdy je nestin ve svalových vláknech nahrazován desminem.

Z provedených studií vyplývá, že nestin je exprimován zejména v průběhu embryonálního vývoje svaloviny a v prvních fázích regenerace v dospělé svalové tkáni. Objevuje se v místech, kde dochází k regeneraci, revaskularizaci a reinervaci. (Čížková, 2019; Mokrý et al., 2004) Nestin je ideálním markerem regenerace kosterního svalu a zároveň s jeho expresí souvisí i procesy revaskularizace a reinervace nově vytvořených svalových vláken. (Čížková, 2019)

Pro experimentální část jsme zvolili takové tkáně, ve kterých jsme předpokládali výraznou expresi nestinu. Proto jsme vybrali myšičí embryonální tkáň (stáří 14 dní) a myšičí svalovou tkáň po poranění kardiotoxinem, která byla odebrána v různých časových intervalech pro sledování procesu regenerace. Výsledky naší práce jsou v souladu s výsledky jiných autorů zabývajících se detekcí nestinu v poškozené a regenerující svalové tkáni. (Čížková, 2019, Mokrý et al, 2004)

Pro detekci nestinu jsme použili různé imunohistochemické metody, abychom docílili co nejlepší detekce a mohli porovnat intenzitu signálu mezi metodami, a také při použití

různých protilátek. Vybrali jsme metody LSAB-HRP a EnVision Flex Kit-HRP, protože pro detekci nestinu v kosterní svalovině tyto dvě metody ještě nikdo neporovnával.

Z porovnání metod použitých pro imunohistochemickou detekci nestinu vychází lépe metoda EnVision. Pozitivita na nestin byla ve tkáních výraznější oproti metodě LSAB a zároveň zde nedocházelo k falešné pozitivitě jiných tkání. Zároveň je metoda EnVision i jednodušší na provedení a časově méně náročná. Téměř všechny reagentie jsou již připravené a součástí kitu, tudíž je metoda uživatelsky příjemnější, zároveň zde odpadají kroky aplikace sekundární protilátky a její inkubace a následně aplikace a inkubace streptavidinu s HRP, jelikož sekundární protilátka je navázána na polymeru spolu s HRP, který se aplikuje jedнокrokově.

Metoda LSAB nevykazovala tak silnou pozitivitu na nestin, naproti tomu byly některé tkáně falešně pozitivní. Používali jsme dva typy primárních anti-nestin protilátek – potkaní a králičí, lépe ze srovnání vychází králičí protilátka, která má k nestinu větší afinitu. Výhodou metody LSAB byla možnost fluorescenční detekce, kdy jsme použili streptavidin značený fluorescenčním barvivem Cy3. Při fluorescenční detekci byl reprezentativní pouze řez tkání 4 dny po poranění, ostatní vykazovaly četnou falešnou pozitivitu (např. erytrocyty, ve kterých se nestin nenachází).

7. ZÁVĚR

Pro detekci nestinu jsme použili dvě imunohistochemické metody – LSAB-HRP a EnVision Flex Kit-HRP. Při porovnání těchto dvou metod jsme dospěli k závěru, že metoda EnVision poskytovala lepší výsledky. V rámci metody LSAB jsme používali dvě primární protilátky – králičí a potkaní. Králičí protilátka ve srovnání s potkaní poskytovala intenzivnější signál. Metodu LSAB jsme použili i k fluorescenční detekci nestinu pomocí fluorescenčního barviva Cy3, kde byl průkazný pouze řez tkání 4 dny po poranění.

V embryonální tkáni jsme nestin detekovali ve veškeré vyvíjející se svalové tkáni, která se ve 14denním embryu skládala zejména z myotub. Kromě kosterní svaloviny se nestin nacházel i v nervové tkáni a ve vyvíjejících se krevních cévách.

Během regenerace po poranění kosterního svalu injekcí kardiotoxinu jsme zachytili expresi nestinu zejména v cytoplasmě myoblastů a myotub. Ve zregenerované svalovině se nestin již nenacházel vůbec nebo jen v malém množství.

Nestin hraje důležitou roli v procesu regenerace poškozené kosterní svaloviny, a to zejména ve druhé a třetí fázi regenerace. Zároveň je nestin jedním z ukazatelů správného embryonálního vývoje.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

CTX – kardiotoxin (angl. Cardiotoxin/cytotoxin)

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DAPI – diaminophenylindol

GFAP – gliový fibrilární kyselý protein (angl. glial fibrillary acidic protein)

HE – hematoxylin-eosin

HKV – husté kolagenní vazivo

HRP – křenová peroxidáza (angl. Horseradish peroxidase)

IF – intermediární filamenta

ICH – imunochemická

LSAB – labeled streptavidin biotin, imunohistochemická metoda

PBS – fosfátový pufr (phosphate buffer saline)

SR – sarkoplazmatické retikulum

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Klasifikace IF, upraveno dle: Cooper, 2019	24
--	----

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek I Podélný řez kosterní svalovinou, barveno HE, zvětšení 200x, foto: Smartzoom, LFHK	11
Obrázek II Podélný řez srdeční svalovinou, barveno HE, zvětšení 400x, foto: Ústav histologie a embryologie, LFHK	11
Obrázek III Podélný řez hladkou svalovinou, barveno HE, zvětšení 400x, foto: Ústav histologie a embryologie, LFHK	11
Obrázek IV Řez kosterním svalem, barveno HE, zvětšení 100x, foto: Smartzoom, LFHK	13
Obrázek V Vývoj svalu, převzato a upraveno z: Carlson, 2018	14
Obrázek VI Řez kosterní svalovinou, barveno HE, zvětšení 200x, foto: Smartzoom, LFHK; 1- svalová tkáň, 2-nervy, 3-krevní cévy, 4-husté kolagenní vazivo (HKV)	15
Obrázek VII Stavba kosterního svalu, převzato z: Uher, 2016	17
Obrázek VIII Sarkomera, převzato z: Anthony L. Mescher, 2018	17
Obrázek IX Satelitové buňky, převzato z: (Zammit et al., 2006)	20
Obrázek X - Struktura kardiotoxinu, převzato a upraveno z: (Hiu & Yap, 2022)	22
Obrázek XI Struktura monomeru nestinu, převzato a upraveno z: (Bernal & Arranz, 2018)	25
Obrázek XII Schéma LSAB metody, upraveno dle: (Key, 2006)	28
Obrázek XIII Řez embryem, barvení HE, zvětšení 100x	39
<i>Obrázek XIV Řez embryem, metoda EnVision, zvětšení 200x</i>	<i>39</i>
<i>Obrázek XV Řez embryem – myotuby, metoda EnVision, zvětšení 200x</i>	<i>40</i>
Obrázek XVI Řez svalem 2 dny po poranění, barvení HE, zvětšení 200x	41
Obrázek XVII Řez svalem 2 dny po poranění, metoda EnVision-HRP, zvětšení 200x	41
Obrázek XVIII Řez svalem 2 dny po poranění, LSAB-HRP, králičí protilátka, zvětšení 200x	42
Obrázek XIX Řez svalem 2 dny po poranění, LSAB-HRP, potkaní protilátka, zvětšení 200x	42
Obrázek XX Řez svalem 4 dny po poranění, barvení HE, zvětšení 400x	43
Obrázek XXI Řez svalem 4 dny po poranění, metoda EnVision-HRP, zvětšení 400x	44
Obrázek XXII Řez svalem 4 dny po poranění, LSAB-HRP, králičí protilátka, zvětšení 100x	45
Obrázek XXIII Řez svalem 4 dny po poranění, LSAB-HRP, potkaní protilátka, zvětšení 200x	45
Obrázek XXIV Řez svalem 4 dny po poranění, metoda LSAB-Cy3, zvětšení 200x	46

Obrázek XXV Řez svalem 8 dní po poranění, barvení HE, zvětšení 200x	47
Obrázek XXVI Řez svalem 8 dní po poranění, metoda EnVision-HRP, zvětšení 200x	47
Obrázek XXVII Řez svalem 8 dní po poranění, LSAB-HRP, králičí protilátka, zvětšení 200x	48
Obrázek XXVIII Řez svalem 8 dní po poranění, LSAB-HRP, potkaní protilátka, zvětšení 200x.....	48

11. POUŽITÁ LITERATURA

- 1 Anthony L. Mescher. (2018). *Junqueirovy základy histologie*. (s. 196-216). Galén.
- 2 Bernal, A., & Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(12), 2177–2195.
- 3 Brooks, S. v. (2003). CURRENT TOPICS FOR TEACHING SKELETAL MUSCLE PHYSIOLOGY. *Advances in Physiology Education*, 27(4), 171–182.
- 4 Carlson, B. M. (2018). *Human embryology & developmental biology* (6. vyd., s. 195-205). Elsevier.
- 5 Cooper, G. M. (2019). *The Cell: A molecular approach* (8. vyd., s. 458–501). Oxford University Press Inc.
- 6 Couteaux, R., Mira, J.-C., & d'Albis, A. (1988). Regeneration of muscles after cardiotoxin injury I. Cytological aspects. *Biology of the Cell*, 62(2), 171–182.
- 7 Čížková, D. (2019). *Účast intermediárních filament a buněk kostní dřene při experimentální regeneraci kosterního svalu*. Univerzita Karlova. LFHK. (s. 4-15).
- 8 Dubovskii, P. V, Lesovoy, D. M., Dubinnyi, M. A., Konshina, A. G., Utkin, Y. N., Efremov, R. G., & Arseniev, A. S. (2005). Interaction of three-finger toxins with phospholipid membranes: comparison of S- and P-type cytotoxins. *The Biochemical journal*, 387(Pt 3), 807–815.
- 9 Dylevský, I. (2009). *Kineziologie - základy strukturální kineziologie*. (s. 164-172). Triton.
- 10 Farlex Partner Medical Dictionary. (b.r.). *Conheim field*. Získáno 9. prosinec 2022, z <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Cohnheim+field>
- 11 Hajzlerová, P. (2014). *Imunohistochemie jako nástroj pro fenotypizaci buněk*. Farmaceutická fakulta UK. (s. 18-37)
- 12 Hardy, D., Besnard, A., Latil, M., Jouvion, G., Briand, D., Thépenier, C., Pascal, Q., Guguin, A., Gayraud-Morel, B., Cavaillon, J.-M., Tajbakhsh, S., Rocheteau, P., & Chrétien, F. (2016). Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. *PLOS ONE*, 11(1), e0147198.
- 13 Hiu, J. J., & Yap, M. K. K. (2022). The myth of cobra venom cytotoxin: More than just direct cytolytic actions. *Toxicon: X*, 14, 100123.

- 14 Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29(4), 577–580.
- 15 Hudák, R., Balko, J., Tonar, Z., & Varga, I. (2017). *MEMORIX Histologie* (s. 140–148). Triton.
- 16 Childs, G. V. (2014). History of Immunohistochemistry. In *Pathobiology of Human Disease* (s. 3775–3796). Elsevier.
- 17 Jarkovská, D., & Martínek, J. (1997). *Histologie* (1. vyd., Roč. 1., s. 18-23). Karolinum.
- 18 Jílek, P. (2014). *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. (s. 43-44). Grada.
- 19 Key, M. (2006). *DAKO Educational guide - Immunohistochemical Staining Methods*. DAKO Educational guide. <https://microtek.ac.in/assets/courses/bsc/BOOK-immunohistochemical%20staining%20methods.pdf#>
- 20 Lékařská fakulta UK. (b.r.). *Fingerland Smartzoom*.
- 21 Maňáková, E., & Seichertová, A. (b.r.). *Metody v histologii* (1. vyd., s. 45). Karolinum.
- 22 Maratová, K. (2013). *Histologické řezy orgány myši a jejich využití ve výuce na střední škole*. Univerzita Karlova. (s.81-89)
- 23 Mokřý, J., Čížková, D., Filip, S., Ehrmann, J., Österreicher, J., Kolář, Z., & English, D. (2004). Nestin Expression by Newly Formed Human Blood Vessels. *Stem Cells and Development*, 13(6), 658–664.
- 24 Neradil, J., & Veselska, R. (2015). Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Science*, 106(7), 803–811.
- 25 Rayment, I. (1996). The Structural Basis of the Myosin ATPase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(27), 15850–15853.
- 26 Slípka, J., & Tonar, Z. (2018). *Základy histologie*. (s. 28-29). Karolinum.
- 27 Srour, M. K., Fogel, J. L., Yamaguchi, K. T., Montgomery, A. P., Izuhara, A. K., Misakian, A. L., Lam, S., Lakeland, D. L., Urata, M. M., Lee, J. S., & Mariani, F. V. (2015). Natural Large-Scale Regeneration of Rib Cartilage in a Mouse Model. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(2), 297–308.

- 28 Tampaki, E. C., Nakopoulou, L., Tampakis, A., Kontzoglou, K., Weber, W. P., & Kouraklis, G. (2014). Nestin involvement in tissue injury and cancer - a potential tumor marker? *Cellular Oncology*, 37(5), 305–315.
- 29 Uher, M. (2016). *Biomechanika svalů*. Farmaceutická fakulta UK. (s. 9).
- 30 Vaittinen, S., Lukka, R., Sahlgren, C., Hurme, T., Rantanen, J., Lendahl, U., Eriksson, J. E., & Kalimo, H. (2001). The Expression of Intermediate Filament protein Nestin as Related to Vimentin and Desmin in Regenerating Skeletal Muscle. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(6), 588–597.
- 31 Vařejčková, M. (2012). *Detekce nestinu ve tkáních*. Farmaceutická fakulta UK. (s. 10-21).
- 32 Wang, Y., Lu, J., & Liu, Y. (2022). Skeletal Muscle Regeneration in Cardiotoxin-Induced Muscle Injury Models. *International journal of molecular sciences*, 23(21).
- 33 Zammit, P. S., Partridge, T. A., & Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(11), 1177–1191.
- 34 Zempleni, J., Wijeratne, S. S. K., & Hassan, Y. I. (2009). Biotin. *BioFactors*, 35(1), 36-46.
- 35 Zhang, B., Li, F., Chen, Z., Shrivastava, I., Gasanoff, E., & Dagda, R. (2019). Naja mossambica mossambica Cobra Cardiotoxin Targets Mitochondria to Disrupt Mitochondrial Membrane Structure and Function. *Toxins*, 11(3), 152.