

# CZYNNIKI WARUNKUJĄCE UKIERUNKOWANY WZROST KOMÓREK NERWOWYCH *IN VITRO*

Ewa Stępień

*Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków*

## 1 WPROWADZENIE

Komórki nerwowe, podobnie jak wiele innych typów komórek zwierzęcych, wykazują zdolność do przemieszczania się tzw. migracji. Ta właściwość, na pozór może zaskakująca w przypadku neuronów, obserwowana jest najwyraźniej podczas rozwoju zarodkowego zwierząt. Przykładem, który dobrze ilustruje właściwości migracyjne komórek nerwowych jest przemieszczanie się komórek grzebieni nerwowych do miejsc docelowych i tworzenie się zwojów nerwów (tzw. zwojów międzykręgowych), struktur ośrodkowego układu nerwowego, np. kości czaszki oraz melanocytów. Innym przykładem są neurony ziarniste w mózgu naczelnych. Są często obiektem badań neurobiologów ze względu na ich zdolność do migracji wzdłuż włókien utworzonych przez komórki gleju i tym samym tworzenia skomplikowanej tkanki kory mózgowej.

Właściwości ruchowe komórek nerwowych to nie tylko migracja, ale także ruchy związane ze wzrostem neuronów i wydłużaniem się aksonów, czyli tak zwane ruchy tropiczne, lub inaczej wzrostowe. Po raz pierwszy odnotował je Harrison [11] 90 lat temu. Zauważył on, że czubek wydłużającej się wypustki komórki nerwowej, nazywany dalej stożkiem wzrostu (ang. growth cone) wykazywał duże zdolności do zmiany kształtu, przemieszczania się, wydłużania się i wycofywania.

Komórki nerwowe odpowiadają na lokalne zmiany środowiska zewnętrznego poprzez stożki wzrostu. Ostateczny jednak kierunek wzrostu jaki przyjmują neurony, a w szczególności te, które przewodzą impulsy do ciała komórki ner-

wowej, jest wypadkową wielu zmiennych, poprzez które środowisko zewnętrzne oddziałuje na neurony. Zmiennymi tymi mogą być zarówno anizotropowe podłoże, na którym rosną komórki, o zmieniających się: adhezywności [3, 4, 17] lub zróżnicowanej rzeźbie [5, 24], jak i gradient stężeń substancji chemicznej [2, 32]. Anizotropia podłoża może polegać również na obecności różnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, które stanowią podłoże dla wydłużających się aksonów [13]. Podłożem dla wzrostu neuronów może być także powierzchnia komórek takich jak komórki nabłonka nerwowego, mezenchymy, komórki mięśni, neurony, astrocyty oraz inne komórki napotkane na drodze przez wydłużające się aksony [12, 21].

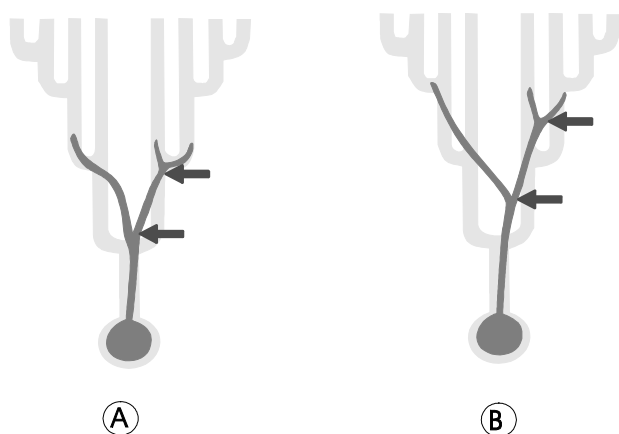
Obecnie uwaga badaczy skoncentrowana jest na poznaniu molekularnego mechanizmu oddziaływania białek naprowadzających stożki wzrostu z ich receptorami w komórce.

### 1.1 *Czynniki warunkujące ukierunkowany wzrost neuronów*

#### 1.1.1 *Białka macierzy zewnątrzkomórkowej biorące udział w naprowadzaniu aksonów*

Rusztowaniem utrzymującym strukturę tkanki, nadającym jej odpowiednie właściwości fizyczne i stanowiącym przyczep dla rosnących komórek jest macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix; skrót – ECM). Ma złożony skład: tworzy ją wiele różnych białek, do których zaliczane są między innymi białka kolagenowe i niekolagenowe glikoproteiny, takie jak: **lamininy, fibronektyny, trombospondina, te-**

**nascyny** i inne [15]. Doświadczenia Fromherza *in vitro* wykazały, że wzrost neurytów z neuronów pijawek (*Hirudo medicinalis*) jest kontrolowany przez wzór na podłożu pokrytym ekstraktem białek ECM [10] (Rysunek 1). Ważnym białkiem biorącym udział w migracji i naprowadzaniu komórek nerwowych jest **fibronektyna**. Stwierdzono, stosując metody znakowania immunofluorescencyjnego, że rozmieszczenie fibronektyny i jej receptorów komórkowych jest zgodne ze ścieżkami migracji komórek grzebieni nerwowych kurczęcia, nie jest jednak ograniczone tylko do tych miejsc [28]. Głównym budulcem macierzy zewnątrzkomórkowej są **białka kolagenowe**. Występują one obficie wzdłuż ścieżek migracji komórek nerwowych i przypuszcza się, że mają duży udział w rozwoju układu nerwowego. Zauważono, że jednorodne, równoległe uporządkowanie włókien kolagenu w okolicach cewy nerwowej związane jest z przemieszczaniem się komórek grzebieni nerwowych, ich polaryzacją kształtu i ukierunkowaną migracją *in vivo* [19]. Stwierdzono też, że białka adhezji komórkowej takie jak: **N-CAM** mają udział w procesie regeneracji nerwów *in vivo* [29]. Podanie poliklonalnych przeciwciał przeciwko N-CAM zakłóca i opóźnia regenerację nerwów u myszy i zakłóca unerwienie siatkówki [26].



Rysunek 1. Schemat ilustrujący w jaki sposób neuryty komórek nerwowych pijawek są naprowadzane przez białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM).

Stożki wzrostu neurytów wędrują po śladach wyznaczonych przez białka ECM (A), natomiast neuryty mają tendencje do skracania się (B), a ich kontakt z podłożem wydaje się być zerwany przez siły, które naprężają neuryty i wpływają na ich przyczepność do podłoża (wg. Fromherzt i Schaden 1994 zmienne).

Receptorami w komórkach dla białek macierzy zewnątrzkomórkowej są **integryny** – białka integralne błon komórkowych, które biorą udział

w adhezji komórek do białek ECM oraz w adhezji typu komórka-komórka. Wśród białek ECM, będących naturalnymi ligandami dla integryn, **laminina** ma silne właściwości indukowania wzrostu neurytów w wielu różnego typu neuronach [7, 13]. *In vitro* laminina wpływa na zależny od jej stężenia wzrost szybkości migrujących neuronów współczulnych [Liang i Crutcher 1990]. Badania z zastosowaniem metod immunofluorescencyjnych wykazują, że laminina występuje wzdłuż ścieżek wzrostu wydłużających się aksonów, zarówno w centralnym jak i w obwodowym układzie nerwowym [23].

### 1.1.2 Chemotropizm komórek nerwowych

Pierwsze obserwacje ukierunkowanego wzrostu neurytów w gradiencie stężeń substancji poczynił *in vitro* Letourneau w 1978 roku [18]. Zaobserwował on dodatnią odpowiedź komórek nerwowych na rozwijający się gradient NGF (czynnika wzrostu nerwów, ang. nerve growth factor). Późniejsze doświadczenia przeprowadzone w latach 80-tych i 90-tych przyniosły więcej dowodów na to, że istnieją drobno- i wielkocząsteczkowe substancje, które mają wpływ na ukierunkowany wzrost i migrację komórek nerwowych, m. in. takie białka jak **netryny** [14], **semaforyny** i **kolapsyna** [8, Keynes i Cook 1995], peptydy (**substancja P**) [6] oraz stwierdzono chemotropiczny efekt działania niektórych neurotransmitrów: **acetylocholin** [32] i **serotoniny**.

## 2 MATERIAŁY I METODY

### 2.1 Hodowle komórek nerwowych z 6-dniowego zarodka kurczęcia

Komórki z mózgu 6-dniowego zarodka kurczęcia izolowano w oparciu o metodę Pattmana z pewnymi modyfikacjami [Pattman *et al.* 1979]. Neurony izolowano przez trypsynizację w 0,1% roztworze trypsyny (Difco) w soli Pucka G, następnie tkankę rozdrabniano poprzez delikatne pipetowanie pipetą pasteurowską. Trypsynę inaktywowano płynem hodowlanym zawierającym surowicę. Agregaty tworzyły się przez spontaniczną agregację komórek w naczyniu hodowlanym. Hodowle prowadzono w pożywce F12/DMEM 10 % FCS w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i wilgotności 95% 37°C. Do hodowli neuronów DRG dodawano czynnik wzrostu nerwów NGF.

## 2.2 Analiza kształtu agregatów

Zjawisko naprowadzania komórek nerwowych przez anizotropowe podłoże obserwowane jako zmianę kształtu agregatów z mózgu zarodka kurczenia opisano ilościowo. W tym celu posłużono się równaniami wyprowadzonymi i zastosowanymi przez Dunna i Browna w 1986 roku [9] do opisu rzutu powierzchni fibroblastów ludzkich hodowanych na rowkowanych podłożach. Metoda ta opiera się na matematycznym opisie nieregularnych dwuwymiarowych kształtów za pomocą wielkości zwanych **momentami**. Do obliczania momentów wykorzystano oprogramowanie (program CYTO cycle 2.0), które w oparciu o równania Dunna i Browna, umożliwiło wyznaczenie parametrów opisujących kształt agregatów: rozciągnięcie (ang. extention), rozproszenie (ang. dispersion), wydłużenie (ang. elongation) i orientację. Zarejestrowany przy pomocy kamery CCD obraz pojedynczych agregatów w hodowlach *in vitro* obrysowywano manualnie, a uzyskany w ten sposób kształt poddawano analizie.

### 2.2.1 Obliczanie momentów kształtu

Dla każdego kształtu agregatu obliczano moment zerowego rzędu, dwa momenty pierwszego rzędu i trzy momenty drugiego rzędu. Te sześć momentów opisuje podstawowe cechy kształtu: moment 0-rzędowy jest to liczba ( $n$ ) pikseli w zdigitalizowanym obrazie agregatu. Pozostałych 5 momentów ( $m$ ) obliczono sumując odpowiednio współrzędne  $x$  i  $y$  wszystkich  $n$  pikseli:

$$\begin{array}{lll} m_{00} = n & m_{10} = \sum x & m_{01} = \sum y \\ m_{20} = \sum x^2 & m_{11} = \sum xy & m_{02} = \sum y^2 \end{array}$$

Ponieważ zostały one obliczone przez dyskretne (po określonej liczbie punktów) sumowanie, a nie całkowanie, momenty te są tylko oszacowaniem momentów rzeczywistych. Jednak przybliżenie jest bardzo dobre jeżeli  $n$  jest duże (ok. 1000).

Wyznaczono również *momenty centralne*, zdefiniowane względem środka ciężkości figury płaskiej (rzutu agregatu na płaszczyznę). Są one niezmiennie względem translacji, to znaczy nie zmieniają się ze zmianą położenia obiektu. Momenty centralne 2-rzędowe dla każdej komórki obliczono jak następuje:

$$\mu_{20} = m_{20} - (m_{10}^2 / m_{00}) \quad \mu_{11} = m_{11} - (m_{10}m_{01} / m_{00})$$

$$\mu_{02} = m_{02} - (m_{01}^2 / m_{00}).$$

Aby momenty centralne pozostały niezmiennie w odniesieniu do zmian wielkości kształtu dokonano normalizacji. Obliczono znormalizowane momenty centralne 2-rzędowe:

$$\eta_{20} = \mu_{20} / m_{00}^2 \quad \eta_{11} = \mu_{11} / m_{00}^2 \quad \eta_{02} = \mu_{02} / m_{00}^2.$$

### 2.2.2 Obliczanie parametrów kształtu agregatów

Zdefiniowano również niezależne od obrotu 2-rzędowe parametry  $\phi_1$  i  $\phi_2$ , gdzie:

$$\phi_1 = \eta_{02} + \eta_{20} \quad \phi_2 = (\eta_{02} - \eta_{20})^2 + 4\eta_{11}^2,$$

na podstawie których wyznaczono dwa niezmienniki obrotu:

$$\lambda_1 = 2\pi (\phi_1 + \sqrt{\phi_2}) \quad \lambda_2 = 2\pi (\phi_1 - \sqrt{\phi_2}).$$

W oparciu o te wielkości obliczono:

– *rozciągnięcie* (ang. extention; symbol – Ex);

Ex =  $\log_2(\lambda_1)$  - jest ono miarą jak bardzo kształt różni się od koła i przyjmuje wartość zero jeżeli kształt jest kolisty i zwiększa się nieograniczenie dla kształtów mniej zwartych;

– *rozproszenie* (ang. dispersion; symbol – Dys);

Dys =  $\log_2(\sqrt{\lambda_1\lambda_2})$  jest minimalnym rozciągnięciem kształtu jakie może być osiągnięte na drodze równomiernego ściskania kształtu wzdłuż jego długiej osi najmniejsza wartość rozproszenia (Dys) wynosi zero, dla kształtów eliptycznych i nie może nigdy przekroczyć wartości rozciągnięcia (Ex);

– *wydłużenie* (ang. elongation; symbol – El); El =  $\log_2(\sqrt{\lambda_1 / \lambda_2})$  jest miarą jak bardzo kształt musi być ściśnięty wzdłuż jego długiej osi, aby uzyskać najmniejsze rozciągnięcie;

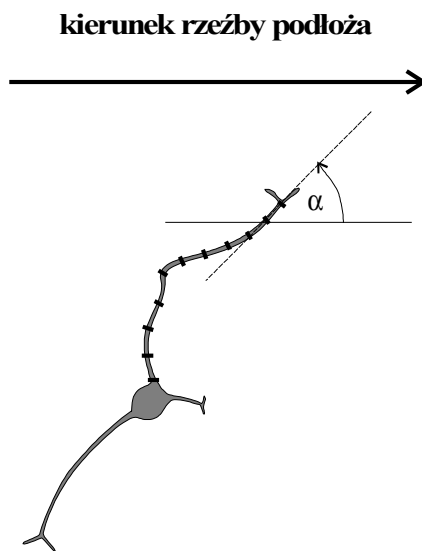
– *orientację* (Or $_{\alpha}$ ) liczoną jako kąt  $\alpha'$  pomiędzy długą osią kształtu  $x'$  a osią  $y'$ , będącą długą osią komórki fibroblastu ludzkiego znajdującego się najbliżej agregatu, dla porównania zmian parametru orientacji w czasie dla różnych warunków hodowli agregatów posłużono się *pojęciem orientacja bezwzględna* (symbol – Or); Or =  $\sqrt{(Or_{\alpha})^2}$ .

## 2.3 Analiza ukierunkowania aksonów

### 2.3.1 Obliczanie długości i orientacji aksonów

Każdy akson, którego obraz uzyskiwano na monitorze, dzielono manualnie przy użyciu programu SPY na odcinki  $d_i$  o długości odpowiadającej 15  $\mu\text{m}$  długości rzeczywistej. Długość aksonu  $d$  obliczono przy użyciu programu MATHEMATICA sumując długości  $n$  odcinków uzyskanych w wyniku podziału aksonu.

$$d = \sum_{i=1}^n nd_i$$



Rysunek 2. Rysunek przedstawia sposób, w jaki wyznaczano kąt  $\alpha$  między kierunkiem rzeźby podłoża a kierunkiem wzrostu danego odcinka aksonu, który poddawano analizie orientacji.

Obliczano kąt  $\alpha$  zawarty między poszczególnymi odcinkami aksonu ( $d_i$ ) a kierunkiem bodźca naprowadzającego (kierunek rowków na podłożu lub długa oś fibroblastów ludzkich) (Rysunek 2). W kontroli, w której aksony rosły na podłożu izotropowym, za oś odniesienia przyjmowano oś OX układu współrzędnych, w który wpisany był zarejestrowany obraz aksonu. W celu znormalizowania orientacji aksonów w skali od 0 do 1, dla każdej wartości kąta  $\alpha$  obliczono wartość  $\cos 2\alpha$  w oparciu o metodę wprowadzoną i zastosowaną przez Nuccitellego i Ericksona [20] do ilościowego opisu ukierunkowanej migracji komórek w polu elektrycznym. Dla odcinków aksonów zorientowanych równoległe do kierunku bodźca naprowadzającego  $\alpha = 0^\circ$  i  $\cos 2\alpha = 1$ . Dla odcinków aksonów zorientowanych przypadkowo, gdzie kąt  $\alpha$

wynosi  $45^\circ$ , wartość  $\cos 2\alpha = 0$ . W przypadku aksonów zorientowanych prostopadle do kierunku bodźca naprowadzającego, dla których  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\cos 2\alpha = -1$ .

### 2.3.2 Analiza statystyczna

Analizy statystycznej wyników dokonano z zastosowaniem programów: STATISTICA 5.1, edycja '97 i Exel 97. Przy ocenie i interpretacji otrzymanych wyników (parametrów kształtu, obliczania kosinusa kąta podwojonego) posłużono się testem nieparametrycznym Kruskal-Wallisa. Do przedstawienia i analizy rozkładu wartości parametrów kształtu agregatów posłużono się skategoryzowanymi histogramami, w których zmienną grupującą był rodzaj podłoża na których rosły agregaty.

## 3 WYNIKI

### 3.1 Badanie roli fibronektyny (białka macierzy zewnątrzkomórkowej) w naprowadzaniu agregatów z mózgu zarodka kurczęcia

Zauważono, że komórki nerwowe z mózgu zarodka kurczęcia wysiane podłożu z warstwy fibroblastów ludzkich przyczepiały się tworząc spontanicznie agregaty. Agregaty te, początkowo symetryczne i zbliżone kształtem do kuli, już po 2 dobach hodowli zmieniały swój kształt na wrzecionowaty (Fotografia 1C) i rozciągały się wzdłuż pasm jakie tworzyły fibroblasty. Agregaty w hodowli obserwowano przez kilka dni i zauważono, że po 7 dniach inkubacji, kiedy agregaty wytworzyły już między sobą połączenia, efekt naprowadzania agregatów jest zniesiony (Fotografia 1D). Zauważono, że agregaty z mózgu 6-dniowego zarodka kurczęcia rosnące na fibroblastach ludzkich blokowanych surowicą przeciw ludzkiej fibronektynie również wykazują pewną orientację. Porównując obraz agregatów rosnących na podłożu blokowanym, z obrazem agregatów rosnących na fibroblastach, nie dostrzega się istotnych różnic (Fotografia 2A-B). Dlatego w celu statystycznego porównania obrazów z doświadczeń posłużono się metodą morfometrii obrazowej.

#### 3.1.1 Analiza morfometryczna agregatów

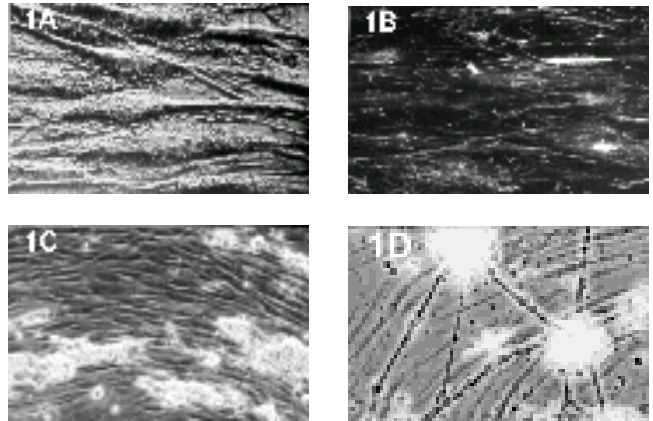
Dokonano pomiarów parametrów kształtu oraz orientacji agregatów z mózgu 6-dniowego zarodka kurczęcia rosnących na warstwie fibrobla-

stów ludzkich, fibroblastach blokowanych surowicą przeciw-ludzkiej fibronektynie oraz dla porównania agregatów rosnących na jednorodnym podłożu – kolagenie. Agregaty na kolagenie stanowiły kontrolę dla pozostałych doświadczeń. Stwierdzono, że podłoże utworzone z utrwalonych fibroblastów ludzkich ma silne właściwości naprowadzające komórki nerwowe. Właściwości te można w istotny sposób osłabić pokrywając fibroblasty surowicą anty-ludzka fibronektyna, co potwierdzono porównując różnice między wartościami  $Or$  agregatów na fibroblastach i fibroblastach blokowanych (patrz: *Tabela 1*).

Tabela 1. Zmiany orientacji średniej ( $Or_{sr}$ ) w czasie dla agregatów neuronów z mózgu 6-dniowego zarodka kurczęcia rosnących na podłożu izo- i anizotropowym.

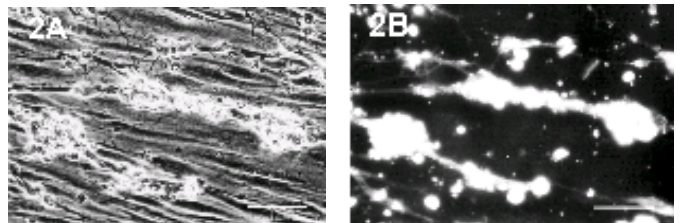
Średnia wartość orientacji bezwzględnej ( $Or_{sr}$ ) [ $x \pm SD$ ]				
Czas inkubacji	10 godzin	30 godzin	50 godzin	70 godzin
Kolagen	42,69 ± 27,28	42,12 ± 23,86	43,74 ± 23,39	42,63 ± 25,32
Fibroblasty	39,87 ± 26,87	27,86 ± 23,52 *	14,56 ± 13,19 *	16,21 ± 14,08 *
Fibroblasty blok. antyFN	43,49 ± 28,43	33,69 ± 24,52 *	31,85 ± 24,79 * ♣	22,24 ± 20,30 *

Agregaty hodowano na podłożu izotropowym (kolagenie) i anizotropowym (utrwalone 3,7 % roztworem formaldehydu fibroblasty ludzkie oraz utrwalone fibroblasty ludzkie blokowane surowicą „anty-ludzka FN”). Obrazy obserwowano w kontraście fazowym co 10 godzin przy użyciu mikroskopu odwróconego OLYMPUS IMT 2 wyposażonego w kamerę CCD i rejestrowano na dysku komputera. Obliczenia parametru orientacji agregatów wykonano z zastosowaniem programu CYTO cycle 2.0. Wartości liczbowe będące średnimi z co najmniej 100 pomiarów ( $Or_{sr}$ ) podano z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SD). Ocenę istotności różnic w wartościach parametru  $Or$  dla danych warunków w porównaniu z kontrolą (kolagenem) przeprowadzono stosując test nieparametryczny Kruskala-Wallisa. Wyniki istotne statystycznie zaznaczono \* ( $p < 0,05$ ). Stosując ten sam test dokonano oceny istotności różnic w wartości  $Or$  dla agregatów rosnących na fibroblastach ludzkich i fibroblastach blokowanych surowicą antyFN. Wyniki istotne statystycznie zaznaczono ♣ ( $p < 0,05$ ).



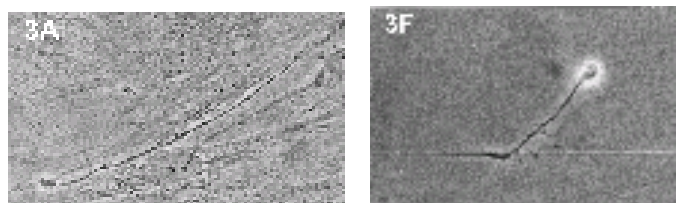
Fotografia 1. Wzrost komórek nerwowych z mózgu zarodka kurczęcia na warstwie fibroblastów ludzkich.

(A) Utrwalone fibroblasty ludzkie; widać, że komórki są ułożone równolegle względem siebie. (B) Po wyznakowaniu przeciwciałami przeciw ludzkiej fibronektynie zaobserwowano, że depozyty fibronektyny są odkładane w sposób uporządkowany, równolegle względem osi komórki. (C) Agregaty z mózgu 6-dniowego zarodka kurczęcia rosnące na warstwie fibroblastów ludzkich po 48 godzinach hodowli; na fotografii widać, że agregaty rozciągają się wzdłuż pasm wytworzonych przez rosnące fibroblasty ludzkie, stanowiące podłoże dla agregatów. (D) Te same agregaty po 7 dniach hodowli; na fotografii można zaobserwować, że efekt naprowadzania agregatów jest zniesiony, agregaty wytworzyły między sobą połączenia. Fotografie A wykonano przy użyciu mikroskopu metalurgicznego JENAWERT (Carl Zeiss Jena) z przystawką do mikrofotografii NIKON UFX-DX, C i D – mikroskopu odwróconego OLYMPUS IMT 2 z przystawką OM-4Ti. Długość prążka 100  $\mu$ m.



Fotografia 2. Agregaty z mózgu 6-dniowego zarodka kurczęcia na warstwie fibroblastów ludzkich po 48 godzinach hodowli.

Komórki nerwowe podczas izolacji wybarwiono przyżyciowo barwnikiem fluorescencyjnym DiI (B). Jak widać na fotografiach agregaty rosnące na fibroblastach pokrytych surowicą przeciw ludzkiej fibronektynie również wykazują ukierunkowany wzrost wzdłuż długiej osi fibroblastów. Długość prążka 200  $\mu$ m.



Fotografia 3. Fotografie przedstawiające zjawisko ukierunkowanego wzrostu neuronów ze zwojów rdzeniowych (DRG) na podłożach anizotropowych.

Komórka nerwowa ze zwojów DRG 6-dniowego zarodka kurczęcia rosnącej na warstwie utrwalonych fibroblastów ludzkich

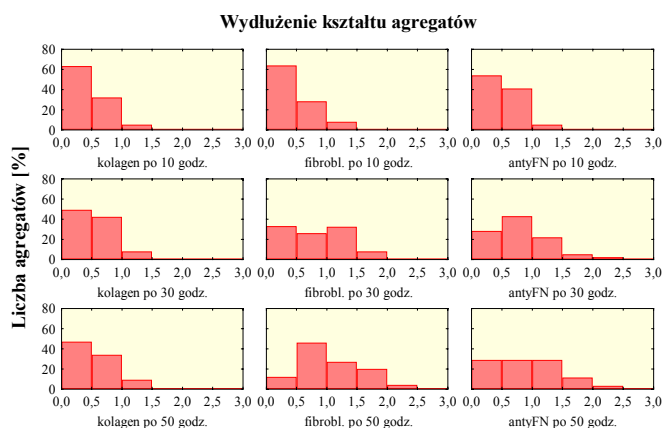
po 48 godzinach hodowli obserwowana w mikroskopie kontrastowo-fazowym (A) oraz neurony DRG *in vitro* hodowane na szkle rowkowanym proszkiem korundowym (nr ziarna 240) i pokrytym poli-L-lizyną (F). Długość prążka 100 $\mu$ m.

Na wykresie (Wykres 1) przedstawiono rozkłady wartości parametru wydłużenia (EI). Jak można zauważyć rozkłady te są niemal identyczne dla wszystkich warunków doświadczenia po 10 godzinach hodowli. Również średnie wartości elongacji ( $EI_{sr}$ ) po czasie 10 godzin, nie różnią się w sposób istotnie statystyczny między sobą ( $p=0,680$ ). Po 30 godzinach inkubacji  $EI_{sr}$  agregatów rosnących na fibroblastach i fibroblastach blokowanych surowicą antyFN zwiększa się o ok. 60% w porównaniu do agregatów na kolagenie, i jak stwierdzono różnice wartości EI agregatów hodowanych na poszczególnych podłożach są statystycznie istotne ( $p=0$ ). Po 50 godzinach inkubacji średnie wartości wydłużenia dla wszystkich warunków doświadczenia różnią się w sposób istotnie statystyczny ( $p=0$ ). Także rozkłady parametru wydłużenia różnią się znacznie, co można zaobserwować porównując histogramy (Wykres 1). Aby stwierdzić czy parametr wydłużenia agregatów rosnących na fibroblastach zmienia się w sposób istotnie statystyczny po zablokowaniu surowicą antyFN, dokonano analizy wyników testem Kruskala-Wallisa. Po 50 godzinach hodowli różnice te są istotne:  $p_{50}=0,045$ .

Efekt wydłużenia agregatów neuronów z mózgu zarodka kurczęcia rosnących na warstwie fibroblastów ludzkich jest więc wyraźniejszy po dłuższym czasie hodowli, komórki nerwowe migrują z agregatów wzdłuż pasm fibroblastów przez co agregaty nabierają kształtu wrzecionowatego z dającą się wyodrębnić jedną osią symetrii.

Blokowanie fibroblastów surowicą „anty-ludzka fibronektyna” powoduje osłabienie tego efektu, czyli osłabienie ukierunkowanej migracji neuronów na podłożu anizotropowym. Izotropowe podłoże kontrolne (kolagen) nie sprzyjało migracji neuronów w sposób ukierunkowany –  $EI_{sr}$  nie zmienia się w czasie inkubacji, a kształt agregatów pozostawał eliptyczny i zwarty.

W celu ilościowego przedstawienia różnic kształtów agregatów neuronów z mózgu 6-dniowego zarodka kurczęcia hodowanych na podłożach izo- i anizotropowych porównano rozkłady zależności parametrów rozproszenia ( $Dy$ ) od wydłużenia (EI) po 10 i 70 godzinach hodowli (Wykres 2A, B). Jak widać na powyższych wykresach rozkład zależność rozproszenia ( $Dy$ ) od wydłużenia (EI) kształtu agregatów hodowanych na podłożu izotropowym (kolagenie) nie zmienia się w czasie inkubacji agregatów. Wartości średnie parametrów ( $Dy_{sr}$ ,  $EI_{sr}$ ) po 10 godzinach wynoszą odpowiednio  $0,064 \pm 0,033$  i  $0,438 \pm 0,266$ , a po 70 godzinach:  $0,049 \pm 0,051$  i  $0,509 \pm 0,320$  ( $\pm$  SD).

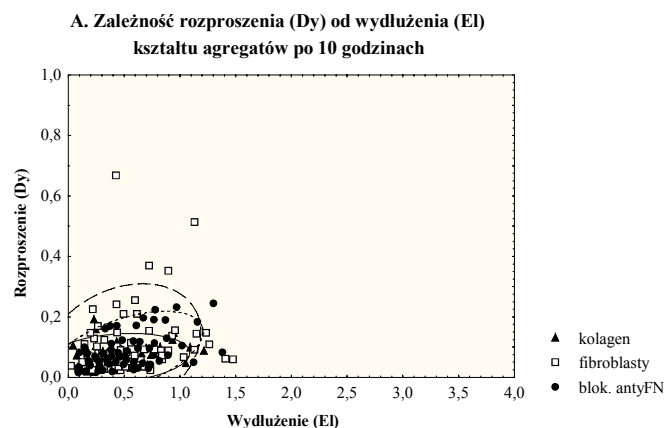


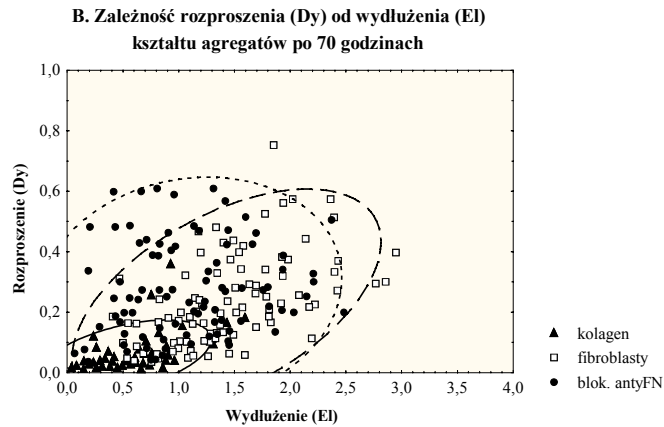
Wykres 1. Na wykresie przedstawiono w postaci histogramów rozkłady parametru wydłużenia (EI) kształtu agregatów neuronów z mózgu 6-dniowego zarodka kurczęcia na podłożach izo- i anizotropowych po różnych czasach inkubacji.

**kolagen** - agregaty na kolagenie (podłoże izotropowe) po 10, 30 i 50 godzinach hodowli

**fibrobl** - agregaty na fibroblastach ludzkich utrwalonych 3,7% roztworem formaldehydu (podłoże anizotropowe) po 10, 30 i 50 godzinach hodowli

**antyFN** - agregaty na fibroblastach ludzkich utrwalonych 3,7% formaldehydem i blokowanych surowicą „anty-ludzka fibronektyna” (podłoże anizotropowe) po 10, 30 i 50 godzinach.





Wykres 2. Wykres zależności parametru rozproszenia ( $D_y$ ) od parametru wydłużenia ( $E_l$ ) kształtu dla agregatów neuronów z mózgu zarodka kurczęcia po 10 (A) i 70 (B) godzinach hodowli.

Agregaty inkubowano przez 10 godzin na podłożu izotropowym (kolagen) i anizotropowym (utrwalone 3,7% roztworem formaldehydu fibroblasty ludzkie oraz fibroblasty blokowane surowicą „anty-ludzka fibronektyna” - blok. antyFN). Żywe agregaty obserwowano przy użyciu mikroskopu odwróconego OLYMPUS IMT 2 wyposażonego w kamerę CCD i obrazy rejestrowano na dysku komputera. Obliczenia parametrów rozproszenia ( $D_y$ ) i wydłużenia ( $E_l$ ) każdego agregatu wykonano z zastosowaniem programu CYTO cycle 2.0, a następnie przedstawiono na wykresie zależność rozproszenia od wydłużenia dla poszczególnych agregatów.

Zaobserwowano natomiast, że po 70 godzinach hodowli agregaty na fibroblastach ludzkich przyjmują kształty bardziej wydłużone w porównaniu do hodowanych na kolagenie i fibroblastach blokowanych surowicą „anty-ludzka fibronektyna” (Wykres 2B). Wartość średniego wydłużenia ( $E_{l\text{sr}}$ ) po 70 godzinach zwiększa się ponad 3-krotnie (od  $0,467 \pm 0,284$  do  $1,428 \pm 0,566$ ) (Tabela 1), a rozproszenia ( $D_{y\text{sr}}$ ) 2,7 raza (od  $0,088 \pm 0,090$  do  $0,239 \pm 0,150$ ). Rozkład zależności rozproszenia od wydłużenia agregatów hodowanych na fibroblastach ludzkich (Wykres 2B) dowodzi o większej liczbie agregatów o kształtach wrzecionowatych (o większych wartościach  $E_l$ ). W przypadku agregatów hodowanych na fibroblastach ludzkich blokowanych surowicą antyFN mniej jest agregatów o kształtach wrzecionowatych (mniejsze wartości  $E_l$ , a większe  $D_y$ ). Po 70 godzinach hodowli w tych warunkach wartość średniego wydłużenia ( $E_{l\text{sr}}$ ) zwiększa się 2 razy (od  $0,512 \pm 0,284$  do  $1,114 \pm 0,557$ ), a rozproszenia ( $D_{y\text{sr}}$ ) 3,5 raza (od  $0,080 \pm 0,054$  do  $0,285 \pm 0,185$ ).

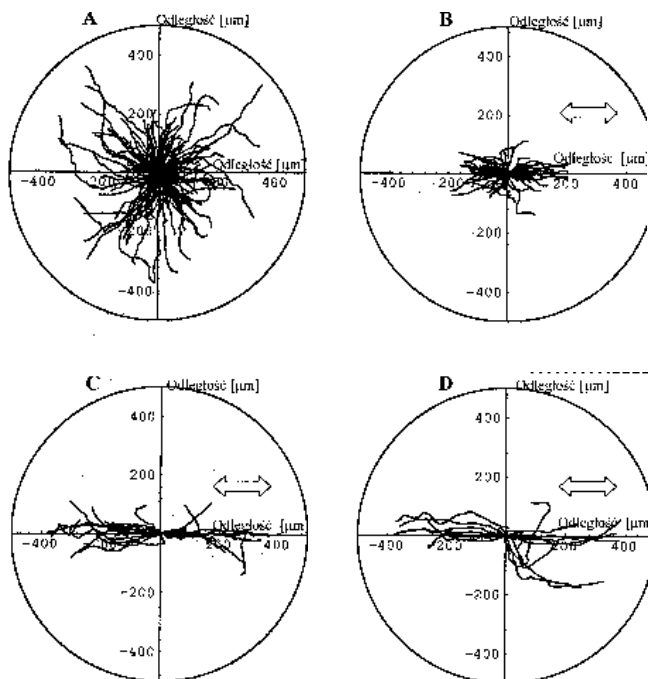
### 3.1.2 Wzrost neuronów DRG ze zwojów rdzeniowych na podłożu anizotropowym

Komórki ze zwojów rdzeniowych (neurony DRG) rosną na podłożu z utrwalonych fibroblastów ludzkich w sposób uporządkowany, wydłużając swoje aksony równolegle do długiej osi fibroblastów (Fotografia 3 A). Zaobserwowano, że kierunek wzrostu aksonów pokrywa się z kierunkiem ułożenia filamentów fibronektyny na powierzchni fibroblastów ludzkich. Stwierdzono, że zablokowanie fibronektyny za pomocą surowicy anty-ludzka fibronektyna nie zakłóca efektu naprowadzania neuronów DRG na warstwie fibroblastów ludzkich (Wykres 3, Tabela 2).

Tabela 2. Porównanie wartości średnich kosinusów kąta podwojonego  $\alpha$  ( $\cos 2\alpha$ ) neuronów DRG z zarodka kurczęcia rosnących na podłożach anizotropowych.

Wartość średnia kosinusa kąta podwojonego $\alpha$ ( $\cos 2\alpha$ ) [ $x \pm SD$ ]	
Kontrola	$-0,04 \pm 0,71$
Rowki	$0,35 \pm 0,64 *$
Fibroblasty	$0,68 \pm 0,47 *$
Fibroblasty blok. antyFN	$0,61 \pm 0,58 *$

Neurony DRG z 6-dniowego zarodka kurczęcia hodowano przez 40 godzin na podłożu izotropowym (kontrola), na podłożu ze szkła rowkowanego proszkiem korundowym i pokrytego poli-L-lizyną (rowki) oraz na podłożu z utrwalonych fibroblastów ludzkich i utrwalonych fibroblastów ludzkich blokowanych surowicą anty-ludzka fibronektyna. Zbadano statystycznie istotność różnic między średnimi w porównaniu z kontrolą testem nieparametrycznym Kruskala-Wallis, \*  $p = 0$ .



Wykres 3. Trajektorie aksonów neuronów DRG rosnących na podłożach o różnych właściwościach fizykochemicznych.

Neurony DRG hodowano przez 40 godzin na: (A) podłożu izotropowym – szkło pokryte kolagenem; (B) podłożu rowkowanym – szkło rowkowane proszkiem korundowym (nr ziarna 240) i pokrytym poli-L-lizyną; (C) warstwie utrwalonych fibroblastów ludzkich 3,7% roztworem formaldehydu oraz na warstwie utrwalonych fibroblastów ludzkich blokowanych surowicą anty-ludzkaFN (D). Żywe komórki obserwowano przy użyciu mikroskopu odwróconego OLYMPUS IMT 2 wyposażonego w kamerę CCD. Obrazy rejestrowano na dysku komputera. Trajektorie aksonów wyznaczono przy użyciu programu MATEMATICA sprowadzając początek każdego aksonu do początku układu współrzędnych;  $n_A=150$ ,  $n_B=71$ ,  $n_C=86$ ,  $n_D=22$ .

Podłoże rowkowane utworzone poprzez zarysowywanie szkła do hodowli proszkiem korundowym powoduje, że neurony ze zwojów rdzeniowych kurczenia (DRG) rosną w sposób uporządkowany wzdłuż rowków (Fotografia 3 F). Wyniki doświadczeń przedstawiono obrazowo w formie wykresów trajektorii komórek nerwowych (Wykres 3). Analizę ilościową opisywanego zjawiska przedstawiono w tabeli (Tabela 2).

#### 4 DYSKUSJA

Powierzchnia oraz skład chemiczny podłoża są jednymi z wielu czynników mających wpływ na ukierunkowanie wzrostu i migracji komórek. Zjawisko naprowadzania (ukierunkowania) komórek przez kontakt z niejednorodnym (anizotropowym) podłożem opisał i nazwał po raz pierwszy Weiss [30] w latach trzydziestych. W późniejszych swoich pracach Weiss wykazał

[31], że naprowadzanie przez kontakt (ang. contact guidance) jest uniwersalnym zjawiskiem, charakterystycznym dla różnych typów komórek, które może mieć fundamentalne znaczenie w procesie morfogenezy. Obecnie uważa się, że naprowadzanie przez kontakt jest jednym z możliwych mechanizmów regulujących ukierunkowany wzrost i ruch komórek nerwowych. Wcześniejsze doświadczenia przeprowadzone *in vivo* [16, 19, 27] i *in vitro* [17, 21, 25, 31] poświęcone badaniu mechanizmów rządzących procesem naprowadzania neuronów potwierdzają hipotezę, że wybór ostatecznej drogi przez aktywną ruchowo komórkę nerwową jest warunkowany wieloma czynnikami, z których kontakt z podłożem naprowadzającym jest istotnym, jeżeli nie najważniejszym czynnikiem.

Badania zjawiska ukierunkowanego wzrostu komórek nerwowych *in vitro* przeprowadzono na specjalnie przygotowanych podłożach, które umożliwiły wywołanie reakcji naprowadzania przez kontakt. Były nimi: utrwalone fibroblasty ludzkie oraz podłoże rowkowane, które cechowała anizotropia rzeźby. Rzeźba podłoża uzyskanego przez utrawienie formaldehydem zwartej warstwy fibroblastów ludzkich, wykazywała regularną niejednorodność topograficzną związaną z kształtem komórek fibroblastów, tworzących zwartą warstwę oraz z depozytami białek macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyny). Anizotropia podłoża związana z uporządkowanym rozmieszczeniem fibronektyny w warstwie fibroblastów ludzkich ma charakter nie tylko topograficzny, ale również chemiczny.

Modyfikacja podłoża, przez zablokowanie fibronektyny za pomocą surowicy skierowanej przeciw ludzkiej fibronektynie, pozwoliła w sposób selektywny wyeliminować jeden z czynników, który ma wpływ na anizotropię podłoża – fibronektynę – jedno z białek macierzy zewnątrzkomórkowej.

Badania, których wyniki przedstawiono w przedkładanej pracy, po raz pierwszy w sposób ilościowy określiły wpływ anizotropii podłoża jakim jest warstwa zwarta fibroblastów ludzkich i podłoże rowkowane, na naprowadzanie aksonów DRG i agregatów z mózgu 6-dniowego zarodka kurczenia. Dzięki zastosowaniu metod matematycznych do opisu tego zjawiska, wykazano udział białka macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyny) w reakcji ukierunkowanej migracji neuronów z mózgu, oraz wy-

kazano, że obecność aktywnej fibronektyny nie decyduje o efekcie naprowadzania przez kontakt neuronów DRG. Udowodniono także rolę rzeźby podłoża w procesie ukierunkowanego wzrostu neuronów DRG.

Zastosowanie systemów komputerowych do rejestracji obrazu komórek umożliwiło określanie zmian kształtu agregatów z mózgu zarodka kurczęcia oraz położenia neuronów DRG w czasie doświadczenia. Pozwoliło to na określenie takich parametrów charakteryzujących ukierunkowany wzrost komórek nerwowych, jak **długość aksonów** i **orientacja aksonów** opisywana jako  $\cos 2\alpha$  oraz parametry kształtu agregatów takie jak **rozciągnięcie** (ang. extension), **rozproszenie** (ang. dispersion), **wydłużenie** (ang. elongation), **orientacja agregatów**.

#### 4.1.1 Parametry ilościowe określane i analizowane w doświadczeniach

W celu ilościowego przedstawienia efektu naprowadzania agregatów komórek nerwowych z mózgu zarodka kurczęcia przez anizotropowe podłoże w pracy posłużono się równaniami wyprowadzonymi przez Dunna i Browna w 1986 roku [9]. Opisu nieregularnych dwuwymiarowych kształtów jakimi są rzuty komórek na podłoże (lub w tym przypadku agregatów komórek), dokonano za pomocą wielkości matematycznych zwanych **momentami**. Momenty mają ważną własność wykorzystywaną do tej pory powszechnie w mechanice, natomiast rzadko docenianą przez innych specjalistów zajmujących się analizą kształtu – dowolny kształt może być opisany z daną dokładnością przez użycie tylu nieskończonych ciągów momentów, ilu wymaga dany opis. Zatem dokładność opisu jest ograniczona tylko przez wybór pierwszych kilku momentów najniższego rzędu. W przypadku analizy kształtu agregatów posłużono się programem licencyjnym CYTO cycle 2.0, który opierając się o równania Dunna i Browna, ignoruje detale obrysu kształtu komórek (wypustki, nierówności konturu wynikające często z braku wprawy operatora) biorąc pod uwagę **podstawowy kształt obiektu**. Dzięki temu pomiary nie podlegają błędom, których wprowadzenie byłoby nieuniknione, gdyby opierać analizę kształtu o powszechnie używane miary jak: obwód lub sprawdzian szcękowy – niezmiernie czułych na obecność jakichkolwiek szczegółów w obrysie kształtu komórki. Wyniki pomiarów nie zależą

od metody pomiaru, lecz od kształtu analizowanych obiektów.

Momenty zostały określone tak, aby zachować wszystkie pożądane cechy w każdym pomiarze kształtu agregatu. Miary przez nie określone nie zależą więc od położenia, rozmiaru i ukierunkowania kształtu w odniesieniu do układu współrzędnych. Wprowadzone niezmienniki momentów są łatwe do analizy ponieważ odpowiadają intuicyjnemu poczuciu kształtu oraz są odpowiednie w badanym tutaj układzie biologicznym.

#### 4.2 Reakcja neuronów z mózgu zarodka kurczęcia na anizotropię podłoża – rola fibronektyny

Uzyskanie wydłużonych kształtów agregatów i uporządkowanie ich wzdłuż długiej osi fibroblastów świadczy o preferencji migrujących neuronów do obierania pewnego kierunku migracji, który jak stwierdzono pokrywał się z kierunkiem odkładania depozytów fibronektyny. Ilościowa analiza kształtów agregatów pokazała, że zablokowanie fibronektyny surowicą przeciw ludzkiej fibronektynie powodowało zaburzenie orientacji bezwzględnej agregatów na fibroblastach. Agregaty przybierały kształty mniej wydłużone (mniejsze wartości parametru wydłużenia), a bardziej rozczłonkowane (większe wartości parametru rozproszenia), niż hodowane na fibroblastach ludzkich. Skrócenie kształtów agregatów i ich większe rozczłonkowanie po zablokowaniu podłoża z fibroblastów ludzkich surowicą przeciw ludzkiej fibronektynie spowodowane jest zaburzeniem zdolności migracyjnych neuronów tworzących agregat. Neurony mogły migrować wolniej (skrócenie agregatów), lub migrowały z tą samą prędkością lecz w sposób przypadkowy (agregaty bardziej rozczłonkowane).

Ukierunkowanie wzrostu aksonów na podłożach anizotropowych jest wynikiem wpływu struktury i rzeźby podłoża na wydłużające się wypustki nerwowe. Jak stwierdzono czynnikiem naprowadzającym w tym przypadku faktura (rzeźba podłoża). Dalsze wyniki autorki [24] pokazały, że komórki nerwowe reagują na subtelne nierówności podłoża, rysy o wymiarach ok. 100 nm, wydłużaniem się filopodiów wysuwanych przez stożki wzrostu neuronów. Reakcja ta zapoczątkowuje następne etapy naprowadzania przez kontakt, takie jak wysunięcia krawędzi

wiodącej wzdłuż rysy, zmianę morfologii stożków wzrostu i w dalszej kolejności zmianę kierunku wydłużania aksonu.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) LIANG S, CRUTCHER KA. *J. Neurosci. Res.* 1993; **36**: 607-620;
- 2) BAIER H, BONHOEFFER F. *Science.* 1994; **265**: 1541-1542;
- 3) BURDEN-GULLEY SM, LEMMON V. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 1996; **35**: 1-23;
- 4) CLARK P *et al.* *J. Cell Sci.* 1993; **105**: 203-212;
- 5) CURTIS ASG, WILKINSON CDW. [w] Motion analysis of living cells. (Red.) D. R. Soll i D. Wessels. Wiley-Liss Inc. 1998; 141-156;
- 6) DE FELIPE C *et al.* *Science.* 1995; **267**: 899-902;
- 7) DODD J, JESSELL TM. *Science.* 1988; **242**: 692-699;
- 8) DODD J, SCHUCHARDT A. *Cell.* 1995; **81**: 471-474;
- 9) DUNN GA, BROWN AF. *J. Cell Sci.* 1986; **83**: 313-340;
- 10) FROMHERZ P, SCHADEN H. *European J. of Neurosci.* 1994; **6**: 1500-1504;
- 11) HARRISON RG. *J. Exp. Zool.* 1910; **9**: 787-846;
- 12) HONIG MG, BURDEN SM. *Dev. Biol.* 1993; **156**: 454-472;
- 13) HYNES RO, LANDER AD. *Cell.* 1992; **68**: 303-322;
- 14) KENNEDY TE *et al.* *Cell.* 1994; **78**: 425-435;
- 15) KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. [w] „Cytobiochemia”. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN 1995; 164-202;
- 16) LEBER SM, SANES JR. *J. Neurosci.* 1995; **15**: 1236-1248;
- 17) LETOURNEAU PC. *Dev. Biol.* 1975b; **44**: 92-101;
- 18) LETOURNEAU PC. *Dev. Biol.* 1978; **66**: 183-196;
- 19) NEWGREEN DF. *Dev. Biol.* 1989; **131**: 136-148;
- 20) NUCCITELLI R, ERICKSON CA. *Exp. Cell Res.* 1983; **147**: 195-201;
- 21) OAKLEY RA, TOSNEY KW. *J. Neurosci.* 1993; **13**: 3773-3792;
- 22) PETTMAN B *et al.* *Nature.* 1979; **281**: 378-380;
- 23) ROGERS SL *et al.* *Dev. Biol.* 1986; **113**: 429-435;
- 24) STĘPIEŃ E *et al.* *Cell Biol. Int. Reports* 1999; *in press*;
- 25) STIER H, SCHLOSSHAUER B. *Development.* 1995; **121**: 1443-1454;
- 26) STOECKLI ET. *Cell Tissue Res.* 1997; **290**: 441-449.
- 27) TOSNEY KW. *BioEssays.* 1991; **13**: 17-23;
- 28) TUCKER GC *et al.* *Development.* 1988; **103**: 82-84;
- 29) WALSH FS, DOHERTY P. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996; **8**: 707-713;
- 30) WEISS P. *J. Exp. Zool.* 1934; **68**: 393-418;
- 31) WEISS P. *J. Exp. Zool.* 1945; **100**: 353-386;
- 32) ZHENG JQ, FELDER M, CONNOR JA, POO M-m. *Nature.* 1994; **368**: 140-144.