MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

CENTRUM PRO VÝZKUM TOXICKÝCH
LÁTEK V PROSTŘEDÍ

IN VITRO METODY A JEJICH RELEVANCE VŮČI SITUACI *IN VIVO* – NOVÉ TRENDY V EXPERIMENTECH S TKÁŇOVÝMI KULTURAMI

Bakalářská práce

Barbara Albrechtová

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Novák, Ph.D

Brno, rok 2013

Bibliografický záznam

Autor: Bc. Barbara Albrechtová, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita

Název práce: *In vitro* metody a jejich relevance vůči situaci *in vivo* – nové trendy v experimentech s tkáňovými kulturami

Studijní program: Ekotoxikologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Vedoucí práce: Mgr. Jiří Novák, Ph.D.

Akademický rok: 2012/2013

Počet stran: 50

Klíčová slova: *in vitro*, *in vivo*, modely, testování toxicity, buňka, buněčná kultura, tkáňová kultura, srovnání, 2D, 3D, kultivace, insert, moderní metody

Bibliographic entry

Author: Bc. Barbara Albrechtová, Research center for toxic coumpounds in the environment,Faculty of Science, Masaryk University,

Title of Thesis: *In vitro* methods and their relevance to the situation *in vivo* – new trends in tissue culture experiments

Degree Programme: Experimental biology

Field of Study: Ecotoxicology

Supervisor: Mgr. Jiří Novák, Ph.D.

Academic Year: 2012/2013

Namber of Pages: 50

Keywords: *in vitro*, *in vivo*, models, toxicity testing, cell, cell culture, tissue culture, comparison, 2D, 3D, cultivation, insert, modern methods

Abstrakt

Tato práce srovnává tradiční způsoby testování toxicity s klasickým i moderním přístupem v testování *in vitro* a popisuje nejnovější trendy v experimentech *in vitro.* Jejím účelem bylo především objasnit a zdůvodnit možnou relevanci nových *in vitro* metod s testováním *in vivo*, její velkou důležitost a vyhlídky do budoucna. Obsahuje teoretickou a experimentální část. Mezi hlavní cíle teoretické části této bakalářské práce patří zmapování dostupné literatury týkající se dané problematiky, hlubší popis a vysvětlení nových trendů v experimentech s tkáňovými kulturami (výhody, nevýhody, možnost praktického využití) a jejich srovnání se situací *in vivo.* Metody a materiály kultivace buněčných kultur *in vitro*, upravování podmínek kultivace, snaha o vytváření 3D podmínek náhradou extracelulární matrix nebo použití podpůrných struktur jsou předměty teoretické části práce. Cílem experimentální části této bakalářské práce je prověřit jeden z alternativních *in vitro* modelů, tedy ko - kultivaci více typů buněk s využitím insertu a nejmodernějšího systému xCELLigence. Experiment má sloužit k přiblížení se k tématu a důkazu toho, že nejnovější metody nejsou pouze předmětem zahraničních autorů, ale i prakticky uskutečnitelné a funkční.

Abstract

This academic paper compares conventional techniques of toxicity testing with classic and modern approach to testing *in vitro*. Also it describes the latest trends of experiments *in vitro*. The purpose of this paper was to point out the importance and the prospect for the future of new *in vitro* methods and also to clarify and to rationalize potential relevance of these methods with testing *in vivo*. This paper is divided into theoretical part and the experimental part. The main goal of theoretical part is reviewing of available literature related to the given issue, deeper description and explanation of new trends in experimenting with tissue cultures (advantages, disadvantages and the possibility of practical application) and its comparison with *in vivo* situation. Other issues in theoretical part are methods and materials for cultivation of cellular cultures *in vitro*, adjusting conditions of cultivation, effort to create 3D conditions by substitution of extracellular matrix or application of supportive structures. The main goal of the experimental part is to examine one of alternative *in vitro* models, the co-cultivation of varied types of cells with use of the latest system xCELLigence. The experiment should give the evidence that the latest methods are not just an issue for foreign authors, but it is a real and possible path.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala za pomoc a trpělivost při vedení mé bakalářské práce mému školiteli panu Mgr. Jiřímu Novákovi, Ph.D. a taktéž i paní RNDr. Ivě Sovadinové, Ph.D. za její připomínky a rady.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 30.5.2013 ……

Barbara Albrechtová

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Kamenice 126/3, 625 00 Brno, fax: +420 549 49 2840, www.recetox.cz

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jméno studentky:	Barbara Albrechtová	**UČO:** 356501
Studijní program/Obor:	Biologie/Obecná biologie	
Název práce:	*In vitro* metody a jejich relevance vůči situaci *in vivo* - nové trendy v experimentech s tkáňovými kulturami	
Název práce anglicky:	*In vitro* experiments and their relevance to situation *in vivo* - new trends in cell culture experiments	
Vedoucí:	Mgr. Jiří Novák, Ph.D.	
Konzultantka:	RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.	
Datum zadání:	30. října 2012	
Datum odevzdání:	květen 2012 (bude upřesněno)	

Postup a zásady pro vypracování:

V posledních letech se zvýšilo úsilí pro vývoj *in vitro* modelů přibližujících se komplexní situaci *in vivo*. Práce bude zaměřena na porovnání "klasických" zaběhlých tkáňových kultur a jejich způsobu kultivace s moderními postupy vedoucími k lepšímu přiblížení se fyziologickým podmínkám (např. hypoxické prostředí, sferoidy, kokultivace) a na kritické zhodnocení jejich relevantnosti vůči situaci *in vivo*.
Cílem bakalářské práce je zpracování kvalitní rešerše zaměřené na shrnutí současných trendů ve využití tkáňových kultur, které vedou k lepšímu přiblížení k situaci *in vivo*.

1) **Práce s vědeckou literaturou, její vyhledávání a zpracování**
   Studentka se naučí pracovat s vědeckou literaturou, vyhledávat publikace v internetových databázích. Literatura předaná vedoucím slouží pouze jako východisko a úvod do řešené problematiky - student musí rozšířit tento základ o nové vědecké poznatky. Získanou literaturu prostuduje a získané informace si smysluplně roztřídí.
   Termín: konec roku 2012, poté průběžně

2) **Teoretická část bakalářské práce – literární rešerše**
   Studentka zpracuje poznatky z literatury do přehledné, srozumitelné, ale zároveň přesné literární rešerše obsahující zejména následující body:
   - Stručný úvod do problematiky využití savčích tkáňových kultur ve vědě
   - Shrnutí hlavních rozdílů klasických postupů oproti situaci *in vivo*
   - Shrnutí hlavních směrů a nových postupů, které mají za cíl zvýšit relevanci pokusů s tkáňovými kulturami tak, aby poznatky získané *in vitro*, měly větší relevanci pro *in vivo* scénáře

   Termíny: návrh obsahu – 15.12.2012, hrubá verze I – 30.1.2013, hrubá verze II – 28.2.2013, finální verze I – 30.3.2013, poslední kontrola před odevzdáním – 20.4.2013

3) **Realizace experimentální části práce**

Kamenice 126/3, 625 00 Brno, fax : +420 549 49 2840, www.recetox.cz

V rámci bakalářské práce studentka zjistí, jestli dochází k ovlivnění růstu buněčných linií TM4 (proliferující myší linie Sertoliho buněk) a TM3 (proliferující myší linie Leydigových buněk) navzájem při kokultivačních experimentech. Výsledky zpracuje do bakalářské práce formou: úvod, materiál a metody, výsledky a diskuse s využitím tabulek a grafů.
Termíny: časové rozvržení experimentální činnosti bude dohodnuto později

Doporučená literatura:

Odborné publikace dohledané pomocí databází Web of Science, Science Direct či přímo přes Google. Zaměřit se na články a webové semináře o nových metodách zahrnujících kokultivaci různých kultur pomocí insertů, 3D tkáňové struktury, organoidy, vliv hypoxie na růst tk. kultur aj.

Příklady článků:

Haycock JW.; 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. Methods Mol Biol. 2011;695:1-15.

Huh D., Hamilton G., Ingbe D.; From 3D cell culture to organs-on-chips. Trends in Cell Biology, 2011; Vol 21, Issue 12, 745-754.

Prezentace:

http://vimeo.com/33966819

V Brně dne: 30. října 2012

Podpis vedoucí práce: Podpis studentka:

Podpis pedagogický zástupce ředitele Centra:

Obsah

Úvod 12
A. Teoretická část 13
1. Testování toxicity 13
1.1 Tradiční přístup 13
1.2 Moderní přístup 15
2. In vitro metody 16
2.1 Klasické modely 18
2.2 Alternativní modely 21
2.2.1 Přiblížení *in vitro* kultivace 2D modelů *in vivo* podmínkám 22
2.2.2 Nerakovinné buněčné modely 26
2.2.3 Multicelulární sferoidy (MCS) 28
2.2.4 3D modely 29
2.2.5 „Lešení“ („Scaffold“) 31
3. Závěr 32
B. Experimentální část 33
1. Teorie 33
2. Materiál a metody 34
3. Postup 35
4. Zpracování dat 37
5. Výsledky a Diskuze 37
6. Shrnutí praktické části 47
Seznam použité literatury 48

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2D = dvou dimenzionální

3D = tří dimenzionální

3R = princip týkající se opatření zaměřených na zásady odpovědného a rozumného užití zvířat při pokusech („Replacement“ = nahrazení, „Reduction“ = snižování, „Refinement“ = zmírňování)

ABP = protein vázající androgeny

ATCC = Americká sbírka typových kultur („American Type Culture Collection“)

ATLA = časopis Alternativy k laboratorním zvířatům („Alternatives To Laboratory Animals“)

DSMZ = Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur („Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“)

ECM = extracelulární matrix

ECVAM = Evropské centrum pro validaci alternativních metod („European Centre for Validation of Alternative Methods“)

EDTA = kyselina diaminethilentetraoctová

FRAME = Fond pro nahrazování zvířat v medicínských experimentech („Fund for the Replacement for Animals in Medical Experiments“)

FSH = folikuly stimulující hormon

GAGs = glykosaminoglykany

HCE = epiteliální buňky lidského kornea („human corneal epithelium“)

iPS = indukované pluripotentní kmenové buňky („induced pluripotent stem cells“)

ISO = Mezinárodní organizace pro standardizaci („International organization for standardization“)

JCRB = Japonská sbírka organismů pro výzkum („Japanese Collection of Research Bioresources“)

MCS = Mnohobuněčný sferoid („Multicellular sferoid“)

MSC = mezenchymová kmenová buňka („Mesenchymal stem cell“)

OECD = Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj („The organisation for economic co-operation and developement“)

PEGDA = polyetylen glykol diakrylát („polyethylene glycol diacrylate“)

PGA = kyselina polyglykolová („polyglycolic acid“)

PLA = kyselina polylaktidová („polylactic acid“)

REACH = Integrovaný systém pro registraci, hodnocení, povolování a evaluaci chemických látek („Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals“)

SMC = buňka hladké svaloviny („Smooth muscle cell“)

Úvod

Již Paracelsus vyslovil fakt, že každá chemická látka je ve své podstatě jed, záleží pouze na dávce, zda se to projeví.

Pro studium chemických látek a jejich akutních i chronických účinků na člověka věda využívá nejrůznějších metod. V této práci jsem se věnovala rešerši dostupné literatury a srovnávala tradiční způsoby testování toxicity s klasickým i moderním přístupem v testování *in vitro* a popsala nejnovější trendy v experimentech *in vitro.* Stále hojně využívané metody testování *in vivo* jsou z hlediska bioetiky čím dál diskutovanější kvůli zvyšujícím se počtům pokusných zvířat nutných k hodnocení nebezpečnosti chemických látek. Účelem této rešerše bylo tedy především objasnit a zdůvodnit možnou relevanci nových *in vitro* metod s testováním *in vivo*, její velký význam a vyhlídky do budoucna.

Mezi hlavní cíle mé bakalářské práce se tedy řadí zmapování dostupné literatury týkající se dané problematiky, hlubší popis a vysvětlení nových trendů v experimentech s tkáňovými kulturami (výhody, nevýhody, možnost praktického využití) a jejich srovnání se situací *in vivo.* Cílem experimentální části této bakalářské práce je prověřit si jeden z alternativních *in vitro* modelů. V tomto případě jde o ko-kultivaci více typů buněk s využitím insertu a nejmodernějšího systému xCELLigence.

Jelikož zatím neexistuje zdroj v Českém jazyce, který by komplexně toto téma řešil, by práce měla posloužit zejména mladým vědcům zorientovat se v základech problematiky bez nutnosti využití pouze zahraniční literatury.

A. Teoretická část

1. Testování toxicity

Nových chemických látek a jejich směsí neustále přibývá a každou z nich, která se bude jakýmkoli způsobem používat, je nutné podrobit testování toxicity, ke kterému používáme řadu laboratorních metod (Lapenna, Gabbert, & Worth, 2012). Vzhledem k náročnosti testování obrovského množství nových chemických látek byl v rámci EU zaveden systém REACH („the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals“) – integrovaný systém pro registraci, hodnocení, povolování a evaluaci chemických látek, jehož účelem je chránit lidské zdraví a životní prostředí a zároveň zachovat konkurenceschopnost průmyslu a umožnit volnou distribuci a transport chemických látek v rámci EU. Jeho cílem je cca v roce 2020 v EU bezpečně vyrábět, dovážet a používat pouze chemické látky se známými nebezpečnými vlastnostmi a identifikovanými zdravotními riziky v celém jejich existenčním cyklu způsobem, který nepoškozuje životní prostředí a zdraví člověka. Toto nařízení EU č. 1907/2006 vstoupilo v platnost 1. června 2007. Součástí obsahu tohoto nařízení je například registrace látek, sdílení údajů a zamezení zbytečným zkouškám, hodnocení, povolování, omezení výroby, uvádění na trh, používání, aj. (REACH, 2012). Proces testování toxicity chemikálií je v mnoha zemích řízen soustavou směrnic Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) (Buschmann, 2013).

1.1 Tradiční přístup

Tradičním přístupem hodnocení toxicity rozumíme pro účely této práce klasické testování metodami *in vivo.* Termín *In vivo* pochází z latiny a dá se přeložit slovy „v živém“, v případě testování *in vivo* se jedná o testy probíhající na celých organismech. Při *in vivo* testování můžeme tedy pozorovat přímou reakci testovaného organismu na aplikovanou cizorodou látku, zahrnující všechny toxikodynamické a toxikokinetické procesy, jako je např. přestup do těla, metabolismus, zastoupení všech typů tkání v organismu atd. (Bhanushali, Bagale, Shirode, Joshi, & Kadam, 2010), což patří k hlavním výhodám těchto testů a k důvodu, proč jsou stále nejpoužívanější a proč většina poznatků o toxicitě chemických látek kolem nás pochází právě z těchto testů na zvířatech (Zurlo, Rudacille, & Goldberg, 1994). Na druhou stranu mezi hlavní nevýhody těchto testů patří nutná extrapolace výsledků na cílový organismus, tj. většinou na člověka. Existují

totiž mezidruhové rozdíly ve vstřebávání látek, v jejich metabolismu a následném vylučování (Page, Flood, & Reynaud, 2012). Proto z hlediska citlivosti k dané látce může být modelový organismus méně či naopak více citlivý, než by teoreticky byl lidský organismus. Nejvhodnější by z těchto důvodů byly klinické studie na dobrovolnících, které mají za úkol testovat například léčiva, ale je zřejmé, že takovéto studie „na lidech" nemůžeme praktikovat především z etických důvodů v rámci testování veškerých chemických látek, které mají potenciální dopad na člověka. *In vivo* testy na zvířatech také nejsou příliš vhodné pro studium mechanizmů účinku studované toxické látky, neboť v sobě zahrnují příliš mnoho faktorů, které mohou znesnadňovat interpretaci výsledků. Toto je jedním z důvodů, proč se vědci snaží přibližovat situaci *in vivo* prostřednictvím nových trendů v testování *in vitro,* ve kterých je možné pracovat v kontrolovaných podmínkách s lidskými buněčnými liniemi, a tím se do jisté míry zbavují potřeby extrapolace získaných výsledků na člověka (Page et al., 2012). Modely *in vitro* se snaží reprodukovat přímo místa působení daných xenobiotik, tj. konkrétní buňky a tkáně, a snaží se docílit toho, aby se tyto tkáně chovaly totožně, jako se chovají v situaci *in vivo*, což je předmětem současného a budoucího výzkumu.

Každoročně je v EU k pokusům použito přibližně 10,7 milionů zvířat. Více než polovina těchto zvířat je použita ve výzkumu, humánní medicíně a k nezbytným biologickým studiím. Dalších 16 % je použito ke kontrole kvality produktů a zařízení v humánní a veterinární medicíně a „pouhých" 10 % z nich si žádá toxikologie a hodnocení rizik (Grindon & Bhogal, 2005). V humánní toxikologii a farmakologii se jedná především o savce od nejmenších hlodavců- laboratorních myší a potkanů, přes králíky až po psy a primáty. *In vivo* testy se navzdory snahám o snižování počtů používaných laboratorních zvířat používají i v rámci legislativy REACH, neboť jsou prozatím v řadě případů nenahraditelné a jejich podoba je definovaná řadou norem mezinárodních institucí, jako jsou např. OECD, a Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO; International organization for standardization). V toxikologii a farmakologii se *in vivo* testy, zvláště na vyšších obratlovcích, využívají při testování akutní a systémové toxicity, orální, dermální a oční toxicity, imunotoxicity, genotoxicity a reprodukční a vývojové toxicity. V ekotoxikologii se zvířata používají například v testech chronické toxicity na hrotnatkách a rybách, testech bioakumulace na rybách nebo testech subakutních účinků na suchozemské organismy ("http://reach.cz/index.htm," 2012). Zákroky, které zvířata při pokusech podstupují, jim často způsobují velké utrpení a po ukončení pokusu bývají zvířata většinou usmrcena. Pokusy na zvířatech jsou širokou veřejností chápány jako nutné

zlo, kterému se s ohledem na naši bezpečnost nelze vyhnout (Pincock, 2013). Je třeba ale zdůraznit, že pokroky ve vědě by nám měly v budoucnu poskytnout možnost naplnit snahu o nahrazení testovacích organismů novými metodami *in vitro*, bez snížení současných bezpečnostních standardů.

V EU upravuje používání pokusných zvířat směrnice 2010/63/EU, v ČR Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání. Každý, kdo chce provádět pokusy na zvířatech v České republice, musí získat akreditaci od Ústřední komise na ochranu zvířat. Každý projekt pokusu pak podléhá schválení odbornou komisí daného zařízení (tedy laboratoře, která má pokus provést) a rezortní komisi příslušného ministerstva. Směrnice 2010/63/EU a Zákon č. 246/1992 Sb. právně kodifikují povinnost použít alternativní metodu místo pokusu na zvířeti vždy, když je schválená a k dispozici.

1.2 Moderní přístup

Náhradou *in vivo* metod alternativami bez nutnosti testování na zvířatech se zabývá řada organizací, například OECD, Evropské středisko pro validaci alternativních metod (ECVAM, „European Centre for Validation of Alternative Methods“) a Fond pro nahrazování zvířat v medicínských výzkumech (FRAME, „Fund for the Replacement for Animals in Medical Experiments“) a na něj napojený mezinárodní vědecký časopis ATLA („Alternatives To Laboratory Animals“). Jejich společným cílem je najít alternativy v testování toxicity chemických látek, které zastávají tzv. princip 3R („Replacement“ - nahrazování, „Reduction“ - snižování, „Refinement“ – zdokonalování/zmírňování). Princip 3R byl navržen v roce 1959 biology Williamem Russellem a Rexem Burchem v knize „Principy humánních experimentálních technik“ (Russel & Burch, 1959) a popisuje strategii pro minimalizování použití zvířat ve výzkumu a při testování toxicity a jejich utrpení způsobené tímto použitím. Za nahrazovací alternativu je považována jakákoli experimentální metoda, která nevyžaduje použití celého živého zvířete. Některé z těchto metod vedou jen k částečnému nahrazení zvířecích modelů, jelikož je nutné využití zvířete pro získání buněk, tkání nebo orgánů pro následné studie *in vitro*. Jiné metody plně nahrazují postupy *in vivo*, neboť nevyžadují žádný biologický materiál získaný od zcela vyvinutého obratlovce. Snižování zahrnuje jakýkoli postup, který vede k minimalizaci počtu potřebných jedinců, ale současně nenarušuje validitu získaných dat nebo maximalizuje zisk dat za použití pouze jednoho zvířete. Zdokonalování či zmírňování se

týká minimalizování bolesti a utrpení, které zvíře prožívá a zlepšení jeho životních podmínek (Bhanushali et al., 2010).

Velké množství nově rozvíjejících se oblastí a technik přispívá k novým přístupům pro náhradu testů na zvířatech tradičně používaných v testování toxicity látek (Haycock, 2011).

Můžeme zde zmínit hlavně postupy využívající:

- počítačové modelování vlastností nově syntetizovaných látek
- modelování farmakokinetických dějů predikující fyziologické rozložení látek v organismu (tzv. fyziologicky založené farmakokinetické a biokinetické modelování)
- technologie čipů (tzv. „microarray“) obsahujících fragmenty DNA nebo proteinů
- tzv. technologie „omics“ zahrnující genomiku, proteomiku, metabolomiku, transkriptomiku, glykomiku a lipomiku
- nesavčí modely – bezobratlí, mikroorganismy nebo raná stadia obratlovců
- epidemiologie, dozor po výrobě látek (tzv. „post marketing surveillance“)
- využití dobrovolníků pro klinické studie.

Pro účely této práce jsou důležité hlavně *in vitro* metody, na které se zaměřuji dále.

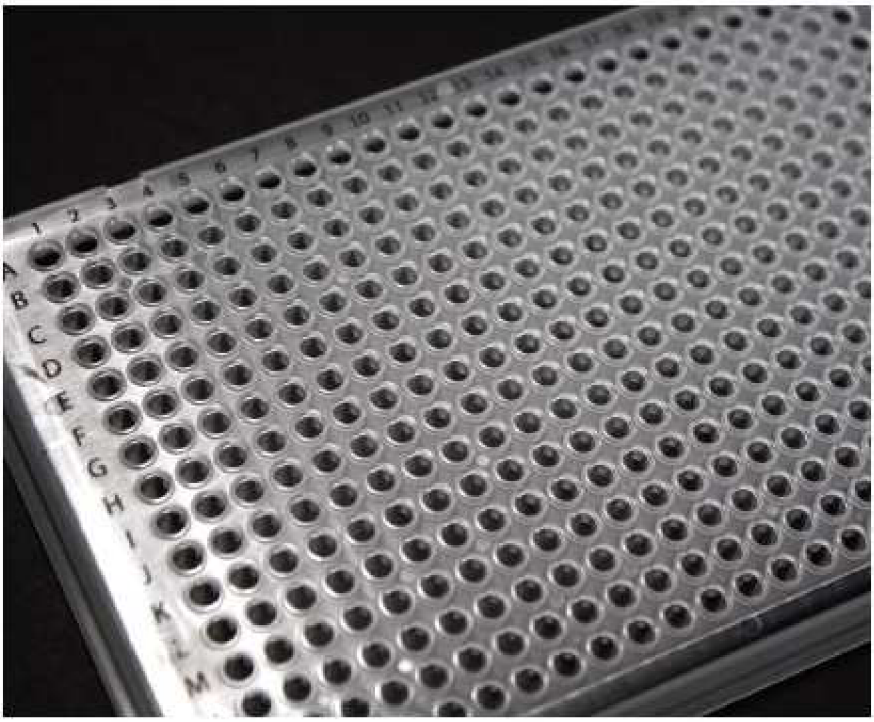
2. In vitro *metody*

V průběhu posledního století prošel obor toxikologie bouřlivým vývojem, kdy začal pro výzkum využívat kromě celých organismů také jejich méně komplexní alternativy označované jako *in vitro*, které kromě bakterií a kvasinek využívají buněčné, tkáňové či orgánové kultury s vhodnými vlastnostmi odvozené z vyšších organismů včetně člověka. *In vitro* metody využívající buněčné a tkáňové kultury se staly důležitým nástrojem používaným pro pochopení důsledků expozice cizorodým látkám a pro hodnocení rizik a došlo k významným pokrokům v jejich rozvoji. Používání chemicky definovaných kultivačních médií a dostupnost lidských buněk proměnila nové technologie metod *in vitro* na hodnotný nástroj vědeckého výzkumu (Spielmann, 2013).

Pojem *in vitro* se překládá jako „mimo tělo“ nebo „ve zkumavce“, doslovný překlad zní „ve skle“. V testech *in vitro* pracujeme pouze s částmi organismů, ať už jsou to samotné buňky nebo tkáně složené z nejrůznějších typů buněk. Právě toto pokládáme za

jedno z největších pozitiv *in vitro* metod v souvislosti s etickou stránkou testování chemických látek. Buňky pro *in vitro* testování jsou také živé, respektive je musíme získat zásahem do živého organismu či jeho usmrcením, ale je zřejmé, že z hlediska etiky je mnohem humánnější pracovat v mnoha testech *in vitro* s buňkami získanými například z jednoho jedince, nežli používat, potažmo usmrcovat, např. několik desítek živých organismů pro každé testování *in vivo* (Bhanushali et al., 2010).

In vitro metody jsou velmi výhodné také z hlediska časového a finančního a z hlediska snadnějšího a rychlejšího provedení. Buněčné i tkáňové kultury jsou dnes poměrně snadno dostupné jako modely pro celou řadu tkání. V *in vitro* testech většinou pracujeme s relativně velmi malým množstvím buněk, neboť působení chemických látek se dá pozorovat řádově na desítkách buněk (Pampaloni, Reynaud, & Stelzer). *In vitro* testy se časově pohybují v řádech minut až hodin, což je nesrovnatelně méně než v testování *in vivo,* umožňují tedy testování mnoha vzorků za krátkou dobu a řadu z nich lze miniaturizovat a automatizovat (Obrázek 1). Na konkrétních buňkách *in vitro* se lépe studují mechanismy účinků cizorodých látek než na celých organismech, na druhé straně ale *in vitro* modely zatím nezahrnují celý rozsah míst účinku a procesů, na které toxikanty mohou v organismu působit, jako jsou přestupy do organismu přes kůži nebo sliznice, jejich metabolismus a následné vyloučení, hormonální sekreci, a neumožňuje tak předpovědět reakci organismu jako komplexu různých tkání, ve kterých probíhá nesčetné množství biochemických procesů, které by mohla testovaná chemická látka ovlivnit (Pampaloni, Reynaud, & Stelzer, 2007). Výsledky *in vitro* testů je tedy nutné extrapolovat na celý organismus, což se často stane „kamenem úrazu“ z hlediska využitelnosti *in vitro* testu na místo testu *in vivo*. V této práci, vzhledem k jejímu zaměření, jsou rozebírány pouze eukaryotické modely, ačkoli existuje mnoho důležitých prokaryotických *in vitro* metod, například velmi využívané testování směsí na bakteriálních kulturách aj.



Obrázek 1 384-jamková deska zobrazující jednu z možností miniaturizovatelnosti a automatizovatelnosti v testování *in vitro*. http://www.scbt.com/datasheet-205893.html; 24.4.13

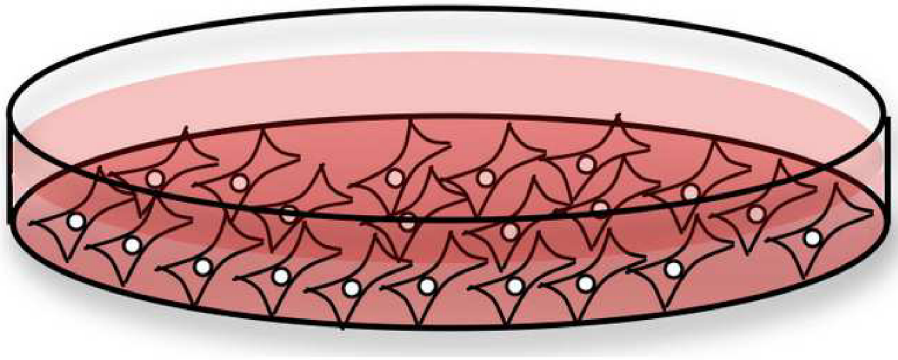
V této práci se setkáváme s několika stěžejními pojmy týkajícími se testování *in vitro* - a to s pojmem 2D kultury (dvou dimenzionální kultury), jimiž myslíme klasické statické pěstování buněk na Petriho miskách, a s alternativními modely, jež představují například buněčné sferoidy nebo 3D kultury (tří dimenzionální kultury), jež se řadí mezi nové trendy v *in vitro* testování.

2.1 Klasické modely

Počátek využívání eukaryotických buněčných kultur v testování toxicity datujeme více než 60 let do minulosti. Většina běžně dostupných substrátů na podporu buněčného růstu se od té doby vyráběla z plastu nebo skla. Buňky na nich rostou v jedné vrstvě (Obrázek 2) a dávají tak kulturám formu plochého 2D povrchu (Haycock, 2011). Aby mohly buněčné kultury přežít *in vitro* a v ideálním případě se začít i dělit, je nutné zajistit jim vhodné kultivační podmínky. Mezi nejdůležitější z nich, které ovlivňují jejich životaschopnost, chování, metabolismus i morfologii, patří povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média a další vlastnosti prostředí, jako je teplota, vlhkost či složení atmosféry.

Kultivace většinou probíhá v uzavřeném systému, kdy do prostředí zasahují pouze množící se buňky a dochází tak ke spotřebě živin z média a současné produkci metabolitů,

jedná se tedy o tzv. statickou kultivaci. Buňky rostoucí na syntetickém plastovém či skleněném povrchu, tvoří nepřirozená seskupení, kdy zhruba 50 % jejich povrchu je vystaveno kultivačnímu mediu a zbylých 50 % je v kontaktu pouze s povrchem kultivační nádoby (Obrázek 2). Minimum povrchu je také v kontaktu s povrchem sousedních buněk, tudíž dochází k velmi omezené mezibuněčné komunikaci (Page et al., 2012).



Obrázek 2 Zobrazení 2D kultivace na Petriho misce, kde buňky jsou v jednovrstevném a plochém uspořádání. http://www.nature.com/scitable/content/cells-growing-in-a-tissue-culture-14264811; 4.5.13

Někdy je nutné povrch potáhnout vhodnou látkou, která adhezi buněk zlepší. Mohou to být polypeptidy složené z aminokyselin s polárním postranním řetězcem (nejčastěji polylysin). Adhezi řady buněk usnadní kolagen (nejčastěji se používá kolagen I), popřípadě jeho hydrolyzát – želatina. Používají se i další adhezní faktory, např. fibronektin či laminin. Některé buňky, zejména krevního původu, je nutné pěstovat v suspenzi (jejich adheze k povrchu by vedla k transformaci do jiného buněčného typu). V suspenzi se buňky udrží díky neustálému promíchávání kultury. Jinou možností je potažení povrchu kultivační nádoby látkou, která adhezi buněk zabrání, např. agarosou (Praktická cvičení z biologie, 2012).

Skleněný či polystyrénový povrch, i když chemicky upravený pro snadnější přisedání buněk a jejich následné dělení nebo potažený látkou zvyšující adhezi buněk, zdaleka neodpovídá složení a vlastnostem tzv. extracelulární matrix (ECM), kterou nacházíme v živé tkáni v mezibuněčných prostorech a která umožňuje uchycení buněk a jejich mezibuněčnou komunikaci, má nezastupitelnou úlohu v buněčné diferenciaci a v dalších procesech, které v buňkách probíhají (Haycock, 2011).

Buňky se zpravidla kultivují při teplotě blízké tělesné teplotě zdrojového organismu, lidské buňky a buňky teplokrevných obratlovců tedy při teplotě 36-37 °C. Atmosféra se u mnoha buněčných či tkáňových kultur obohacuje o oxid uhličitý do finální

koncentrace 5-7%, naproti tomu koncentrace O_2 se většinou blíží koncentraci ve vzduchu, tj. 20%. Zvýšená koncentrace CO_2 se podílí na udržení pH (u savčích buněk okolo 7,2-7,4) média často společně s bikarbonátovým pufrem (Gibco, 2013).

Kultivované buňky rostou v médiu, které do značné míry napodobuje extracelulární tekutinu. Mělo by mít vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti a musí obsahovat ve vhodné koncentraci látky, které buňky potřebují pro život a proliferaci. Jde o vodné roztoky obsahující relativně mnoho, někdy i několik desítek, složek. Mezi nejvýznamnější látky obsažené v kultivačních médiích patří anorganické soli, pufry, glukosa a případně i jiné zdroje energie, vitamíny, aminokyseliny, bílkoviny, růstové faktory, některé peptidy, mastné kyseliny a lipidy a stopové prvky. Cílem je vytvořit plně definované médium, které by mělo stále stejné vlastnosti (Wappler, Rath, Laufer, Heidenreich, & Montzka, 2013). Většina buněk ale nedokáže v takovémto mediu dlouhodobě růst, protože potřebuje komplexní směsi růstových faktorů, které je zatím velmi složité připravit. Proto se využívá přídavku krevního séra, které tyto esenciální látky obsahuje. Jedná se většinou o jedinou nedefinovanou součást média. Přestože je přípravě séra věnována maximální péče, není technicky možné zabezpečit jeho naprosto totožné charakteristiky mezi jednotlivými šaržemi, což znesnadňuje opakovatelnost experimentů v čase. Obohacení kultivačního média sérem má, kromě zmíněné nemožnosti sérum zcela definovat, i další úskalí a to je riziko přenosu infekce. Séra se běžně sterilizují filtrací, čímž se spolehlivě zabrání přenosu většiny bakterií a plísní, významně se sníží riziko přenosu mykoplasmat. Nebezpečí přenosu virů také klesá, nelze je však vyloučit, totéž platí o riziku přenosu prionů (Gibco, 2013). Rozdělení médií podle toho, zda jejich součástí je či není sérum, je asi nejvýznamnějším klasifikačním kritériem. Určitým přechodem mezi médii se sérem a bez něj jsou média s nízkým obsahem séra (kolem dvou procent ve srovnání s obvyklými deseti procenty u médií se sérem) (Gibco, 2013). Bezsérová média, jež jsou plně definovaná, neboť všechny potřebné mikroživiny, růstové faktory a další látky se do nich dodávají jednotlivě nebo v jednoduchých, dobře definovaných směsích, jsou náročnější na přípravu i nákladnější ve srovnání s médii s přídavkem séra (Gibco, 2013).

V klasických modelech se velmi často používají buňky rakovinné, můžeme používat ale například i primární buňky či imortalizované buněčné linie. Používané buňky by měly být geneticky stabilní, měly by zajistit reprodukovatelné výsledky a měly by být dobře charakterizované z hlediska rychlosti dělení, optimálních růstových podmínek atd. Při výběru buněčné kultury jako modelového systému pro prvotní skríning (testování akutní a chronické toxicity, vázání na proteiny, aj.) je důležité dostatečně charakterizovat

dané buňky a porozumět jejich morfologii a biochemii, také je důležitý druh organismu a orgán, ze kterého buňky pochází. K dispozici je mnoho buněčných linií, které můžeme k testování toxicity využívat (např. MDCK, Caco, V79, HUH7 a mnoho dalších), které jsou komerčně k dostání z různých sbírek buněčných kultur, jako např. ATCC („American Type Culture Collection"), DSMZ („Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen") a JCRB („Japanese Collection of Research Bioresources"). Většina 2D modelů také využívá pouze jediného typu buněk a nebere tedy do úvahy spolupůsobení více typů buněk, ke kterému dochází v tkáních živých organismů (Haycock, 2011).

Klasické modely mají kapacitu pro testování velkého množství látek v krátkém časovém úseku a je k nim zapotřebí jen minimální množství testované směsi (McKim, 2010). Jsou miniaturizovatelné a automatizovatelné, testování je tedy rychlé a není tak nákladné ve srovnání s moderními metodami nebo s testováním *in vivo*. Jsou vhodné pro studium mechanizmu účinků chemických látek.

2D modely měly i přes své nevýhody nezastupitelné místo v testování toxicity látek a byly základem *in vitro* metod používaných v buněčné a tkáňové biologii a farmakologii (Page et al., 2012), ovšem při studiu poznatků získaných na těchto 2D modelech je třeba brát na zřetel jejich limitace a fakt, že fyziologie živočichů nemůže být nikdy přesně reprodukována používáním jednovrstevných kultur jednoho buněčného typu („cellular monolayer"). Řada alternativních modelů, kterým se věnuji v následující podkapitole, vychází právě ze znalostí získaných na těchto klasických modelech.

2.2 Alternativní modely

Procesy probíhající ve zdravých buňkách od rozdělení, přes proliferaci až po migraci a apoptózu jsou přesně kontrolované série událostí, které závisí na principech časoprostorové organizace v trojrozměrném prostoru. Klasické pěstování buněčných kultur ve dvou dimenzích nedokáže ani zdaleka napodobit tuto složitou prostorovou síť, která zahrnuje mechanická spojení, komunikaci mezi buňkou a mezibuněčnou matrix a také komunikaci mezi sousedními buňkami (Haycock, 2011).

Pro přiblížení *in vitro* modelů *in vivo* situaci a jejím podmínkám byla použita řada přístupů. Společným cílem je překlenout propast při testování toxicity mezi používáním celých živých organismů na jedné straně a klasických jednovrstevných tkáňových kultur na straně druhé. Je proto nezbytné vytvořit *in vitro* prostředí, které napodobuje co nejvíce

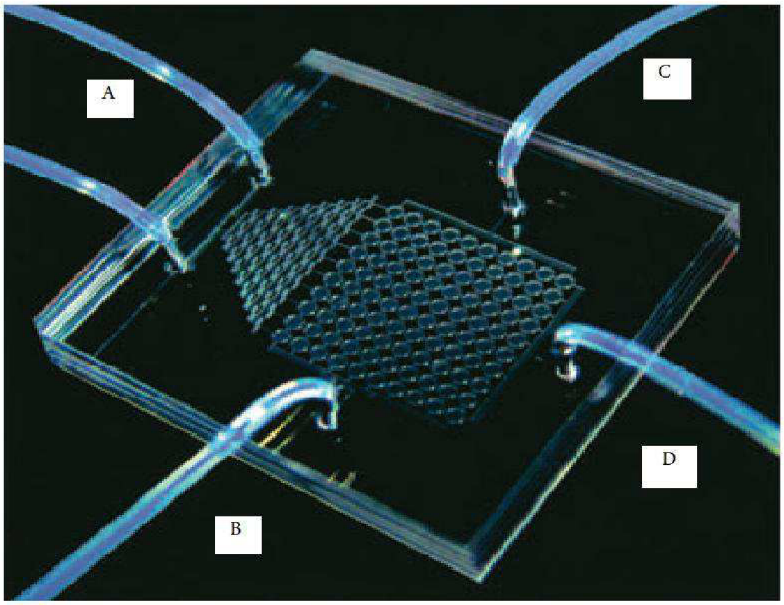
složitost cílové tkáně, což umožňují zejména pokroky v chemii materiálů a v buněčné a tkáňové biologii.

2.2.1 Přiblížení *in vitro* kultivace 2D modelů *in vivo* podmínkám

Aby pěstované buňky za podmínek *in vitro* přežívaly, dělily se a zachovávaly si stejné morfologické i biochemické vlastnosti jako v živém organismu, je třeba jim zajistit vhodné podmínky blížící se co nejvíce situaci *in vivo*. Pouhá změna kultivačních podmínek u 2D modelů více směrem k *in vivo* situaci se řadí k prvním alternativním přístupům v *in vitro* testování toxicity.

Kultivace 2D modelů v atmosféře s mnohonásobně vyšším parciálním tlakem kyslíku, která neodpovídá situaci *in vivo* ve tkáních, vede k tomu, že takto kultivované buňky se morfologicky i funkčně liší od buněk *in situ*, odkud byly izolovány, a u některých typů se snižuje úspěšnost jejich kultivace *in vitro*. Z tohoto důvodu se přechází na tzv. hypoxickou kultivaci, u které na rozdíl od podmínek v klasické kultivaci, kdy se okolní atmosférická koncentrace O_2 (20 %) nijak neupravuje, snižuje obsah kyslíku na podobnou úroveň, která se vyskytuje v živých tkáních (3 %-5 %) (Atkuri, Herzenberg, Niemi, & Cowan, 2007).

Klasickou, běžně užívanou statickou kultivaci 2D modelů (Obrázek 2), která je velice vzdálená *in vivo* prostředí, které není v žádném případě statické, se snaží řešit kultivace v tzv. mikrofluidních kultivačních zařízeních (Obrázek 3), jejichž výhody spočívají v relativně snadné výrobě, v miniaturizaci a s tím spojenou nízkou spotřebou kultivačního media i testované látky a v možnosti kontroly lokálního buněčného mikroprostředí bez interference z vnějšího prostředí i chování buněk (Gao, Liu, Jiang, & Lin, 2012).

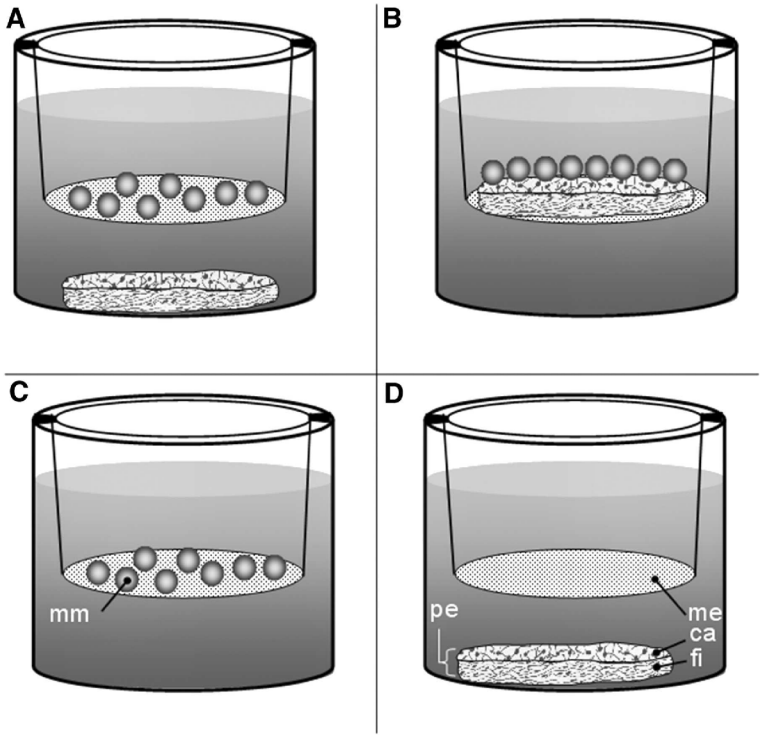


Obrázek 3 Zařízení pro mikrofluidní kultivaci buněk. (A) generátor koncentračního gradientu (B) vstup media („perfusion“) (C) výstup media (D) výstup odpadu; http://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=9577931; 28.4.13

Používání insertů („filter well inserts“) také zlepšuje kultivaci 2D modelů, neboť buňky na nich rostoucí se polarizují, tzn., že lze odlišit apikální a bazální membránové povrchy. Dále umožňuje ko-kultivaci odlišných typů buněk, což vše alespoň částečně přibližuje *in vitro* kultivaci situaci *in vivo* (Page et al., 2012), neboť komunikace mezi různými typy buněk má velmi úzký vztah k fyziologickým i patologickým stavům v živé tkáni (Gao et al., 2012). Jedná se o vložku pro kultivaci buněk dávající se do běžných kultivačních desek a misek, která obsahuje membránu s póry o různém průměru, umožňující tak prostor oddělit na dva kompartmenty (Obrázek 4). Membránu lze pokrýt různými typy substrátů, které usnadňují buňkám jejich přichycení k membráně, ale zároveň nebrání, ba naopak podporují sekreci různých molekul z bazálního i apikálního povrchu membrány. Inserty byly jednou z prvních technologií, které se začaly přibližovat 3D kultivaci a to tím, že jejich využitím dochází k expozici buňky ze dvou stran, jelikož umožňuje oběma stranám buněčné membrány komunikovat s prostředím (Justice, Badr, & Felder, 2009).

Obrázek 4 Insert s membránou k vložení do 6-jamkové desky
http://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=9577931; 28.4.13

Výběr typu membránového insertu hraje klíčovou roli v úspěšném využívání této techniky. Existuje celá řada různých insertů - mezi jejich nejdůležitější vlastnosti patří formát a velikost, také hustota a velikost pórů. O tom, který insert je vhodný k použití, rozhoduje především typ buněk, se kterým v experimentu pracujeme (Justice et al., 2009). Existují různé možnosti využití insertů jako např. ko-kultivace buněk komunikujících parakrinně pomocí chemických signálů, ko-kultivace buněk, které se vzájemně dotýkají, pěstování monokultury, která je rozdílně exponována z bazální a apikální strany nebo pěstování monokultury pod insertem (Obrázek 5). Komerčně dostupné inserty jsou dodávány s příručkou, která nám může pomoci s výběrem insertu, jeho použitím a přípravou samotné buněčné kultury (Justice et al., 2009).



Obrázek 5 Schématické znázornění možných způsobů kultivace s použitím insertů reprezentováno na modelu lidské kosti (A) Parakrinní ko-kultura: inserty oddělují buněčnou kulturu na insertu od jiné kultury na dně jamky - obě kultury se vzájemně ovlivňují přenosem chemických signálů (B) Ko-kultura, kde se oba typy buněk vzájemně dotýkají a mohou si přímo vyměňovat chemické posly (C) Monokultura buněk umístěná na insertu umožňuje rozdílnou expozici shora a zespodu, což může umožnit funkční polarizaci buněk podobně jako v *in vivo* podmínkách (D) Monokultura buněk umístěná na dně jamky, pod insertem, tj. klasická 2D metoda kultivace. me: porózní membrána; mm: „micromass pellets" – buňky účastnící se osifikace; pe: lidský periost; ca: vrstva kambia v periostu; fi: vláknitá vrstva periostu. http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/49/2/218/F1.expansion.html; 28.4.13

V neposlední řadě je nutné, v rámci podmínek kultivace, zmínit ECM. Jedná se o komplex látek, jako jsou strukturní proteiny a další biologické molekuly, tvořící životní prostředí buněk. ECM se podílí na komunikaci mezi buňkami, poskytuje základ pro buněčné chování, identitu a funkci (Justice et al., 2009). Toto složité prostředí nelze přesně reprodukovat, ale můžeme reprodukovat nebo napodobovat jeho součásti. Nejznámější a nejčastěji používané proteiny ECM jsou proteiny kolagen a laminin, ze sacharidů jsou to pak glykosaminoglykany (GAGs), jako je chondroitinsulfát atd. (Justice et al., 2009). Mezi komerčně vyráběné gely k účelům napodobení ECM patří Matrigel, Extracel nebo Algimatrix. Například Matrigel je gelovitý materiál vytvořený buňkami Engelbreth-Holm-Swarmova myšího tumoru, který je využíván především pro kultivaci epiteliálních buněk. Extracel je podobný struktuře kloubní chrupavky, jedná se o stlačitelný hydrogel složený z hyaluronanu, želatiny a polyethylenglykol-diakrylátu (PEGDA). Tato definovaná struktura může být modifikována dle účelu použití přídavkem dalších složek ECM, např. lamininu. Algimatrix není živočišného původu, jedná se o strukturu z lyofilizovaného alginátového

gelu (alginát je polymerovaný cukr z hnědé chaluhy, ve kterém vznikají bivalentní kationty a tvoří tak záporně nabitý hydrogel). Záměr používání Algimatrixu spočívá v tom, že umožní buňkám zaplnit póry v hydrogelu a sekretovat endogenní ECM složky, což podporuje vývoj morfologie, struktury a chování buněk, které se podobá stavu v podmínkách *in vivo* (Justice et al., 2009). Toto mikroprostředí je vhodné pro rostoucí populace primárních nebo kmenových kultur ve sferoidech.

2.2.2 Nerakovinné buněčné modely

Velmi často se pro testování *in vitro* toxicity používají buňky izolované z nejrůznějších typů nádorů z důvodu, že se dají poměrně snadno kultivovat a že jsou schopny se neustále množit. V podstatě nepodléhají stárnutí a teoreticky je můžeme používat relativně po neomezeně dlouhou dobu. Tyto modely se však ukázaly být nevhodné kvůli tomu, že se svými vlastnostmi liší od normálních buněk a často nejsou příliš stabilní, tj. podléhají změně fenotypu a genotypu v rámci svého dlouhodobého dělení. Jejich reakce na testované chemické látky tedy nemusí příliš přesně predikovat reakce nenádorových buněk živých organismů (Bhanushali et al., 2010). V rámci řešení nedostatků používání rakovinných buněčných modelů se snaží věda o využití jejich alternativ, zvláště pak o využití nenádorových lidských buněk, aby se tak bylo možné vyhnout jinak nutné extrapolaci výsledků na člověka.

Využívají se tzv. primární buněčné kultury, které vznikají enzymatickým rozvolněním buněk původní tkáně, které si udržují vlastnosti rezidentních buněk *in situ* (Bhanushali et al., 2010). Ze všech typů kultur jsou tedy buňkám v živých tkáních nejpodobnější. Tyto buňky mohou být již kompletně diferenciované a již se nedělí nebo se mohou ještě dále omezeně diferencovat a dělit se. Je však obtížné je získat a kultivovat *in vitro*. Oproti situaci *in vivo* v těchto kulturách nedochází k imunitním odpovědím a hormonálnímu řízení (Bhanushali et al., 2010). Buňky většinou přežívají pouze několik dní a jsou „smrtelné“ tzn., nemají schopnost neomezeného dělení jako rakovinné buňky. Některé z nich se přizpůsobují kultivačnímu mediu a zvoleným podmínkám, a pokud je přeneseme do nového media (tzv. pasážování), vznikají sekundární buněčné kultury, které se skládají, oproti primárním, už pouze z jednoho vyselektovaného typu buněk a mohou se pasážovat až 50x (Greplová, 2013). Cílenou selekcí z primárních kultur můžeme získat tzv. imortalizované buněčné linie, které můžeme pasážovat po neomezeně dlouhou dobu, neboť jsou schopné neomezeného růstu v prostředí *in vitro*. Imortalizace však často mění některé

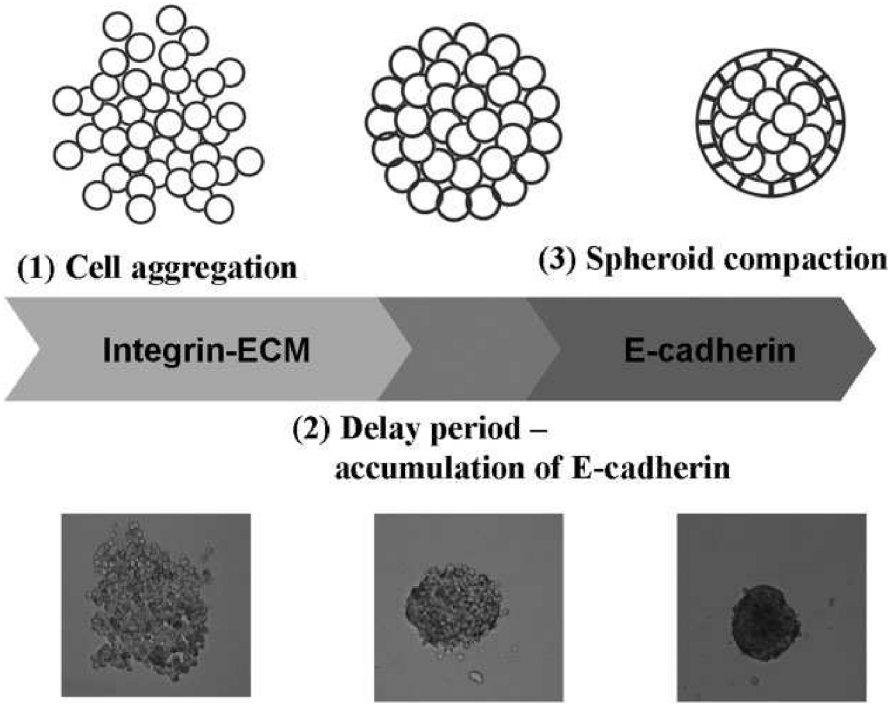
jejich charakteristiky a funkce (Bhanushali et al., 2010). Tyto změny se mohou projevit v jejich fenotypu a tyto buňky se začnou výrazně lišit od buněk tkáně, ze které pocházejí (Praktická cvičení z biologie, 2012).

V posledních letech se hledá relevantnější typ a zdroj buněčných kultur pro testování toxicity látek u lidí. Dospělé či embryonální kmenové buňky a tzv. iPS buňky ("induced pluripotent stem cell" - indukované pluripotentní kmenové buňky) se zdají být vhodnými kandidáty (Yu et al., 2007). Dospělé kmenové buňky získáváme převážně z kostní dřeně, jejich izolace je však poměrně náročná a také nám ji komplikuje fakt, že ve stárnoucí kostní dřeni se nachází čím dál tím méně kmenových buněk a také ztrácí schopnost správně proliferovat a diferencovat se. V každém orgánu se nachází kmenové buňky, z nichž se pak diferencují funkční buňky toho kterého orgánu, můžeme tedy získávat například kmenové buňky z jater, či z kosterních svalů nebo tukové tkáně (Praktická cvičení z biologie, 2012). Poměrně novou alternativou je získávat kmenové buňky z pupečníkové krve, která je na ně, na rozdíl od kostní dřeně a jiných tkání a orgánů, velmi bohatá a ze které je velmi dobře možné je izolovat a následně kultivovat (Romanov, Svintsitskaya, & Smirnov, 2003).

Další skupinou kmenových buněk představují embryonální buňky, které lze získat z embryí ve stadiu blastocysty nebo moruly. Výhodou embryonálních kmenových buněk je jejich pluripotence-schopnost se diferencovat na jakýkoli buněčný typ přítomný v těle, jejich nevyřešenou nevýhodou je fakt, že se z nich můžou utvářet tumory (Bhanushali et al., 2010). Také se poměrně obtížně kultivují. Etickou otázku týkající se experimentů s embryy (hlavně lidskými) by mohly vyřešit iPS buňky, jedná se o uměle připravené kmenové buňky, vytvořené z původně somatické buňky dospělého jedince. Zatímco tato původní buňka byla diferencovaná, následkem změny genové exprese, resp. pomocí virových vektorů se do buněk vloží geny, které způsobí, že je iPS buňka pluripotentní a velmi podobná kmenovým buňkám embryonálním. Výhodou iPS buněk je, že se jedná o buňky pacientovi vlastní a tudíž odpadá problém s imunologickou intolerancí, jako je tomu u buněk derivovaných z embryí (Yu et al., 2007). Při tvorbě iPS buněk se však někdy používají viry, které by mohly následně vyvolat rakovinné bujení, což je jejich velká nevýhoda.

2.2.3 Multicelulární sferoidy (MCS)

MCS, tzv. multicelulární sferoidy („multicellular spheroid“) se nacházejí na pomezí 2D a 3D struktur (Lin & Chang, 2008). Oproti 2D strukturám jsou plastičtější a více se svými vlastnostmi přibližují tkáni. MCS vznikají procesem buněčné agregace, kdy síly, na jejichž základě buňky adherují, jsou silnější, než síly působící mezi buňkami a substrátem, v němž jsou kultivované. Tyto neúplné napodobeniny 3D modelů mohou být používány jako středně pokročilé systémy mezi 2D a 3D modely a sloužit pro přenesení poznatků z 2D modelů do dimenzí trojrozměrných a jsou někdy nazývány jako tzv. 2,5D modely (Obrázek 6). Sferoidy jsou vytvořeny velmi rychle a relativně levně ve velkém množství a mohou být vhodné pro miniaturizaci a automatizaci procesu testování toxicity (tzv. „high throughput“ systém) (Page et al., 2012)



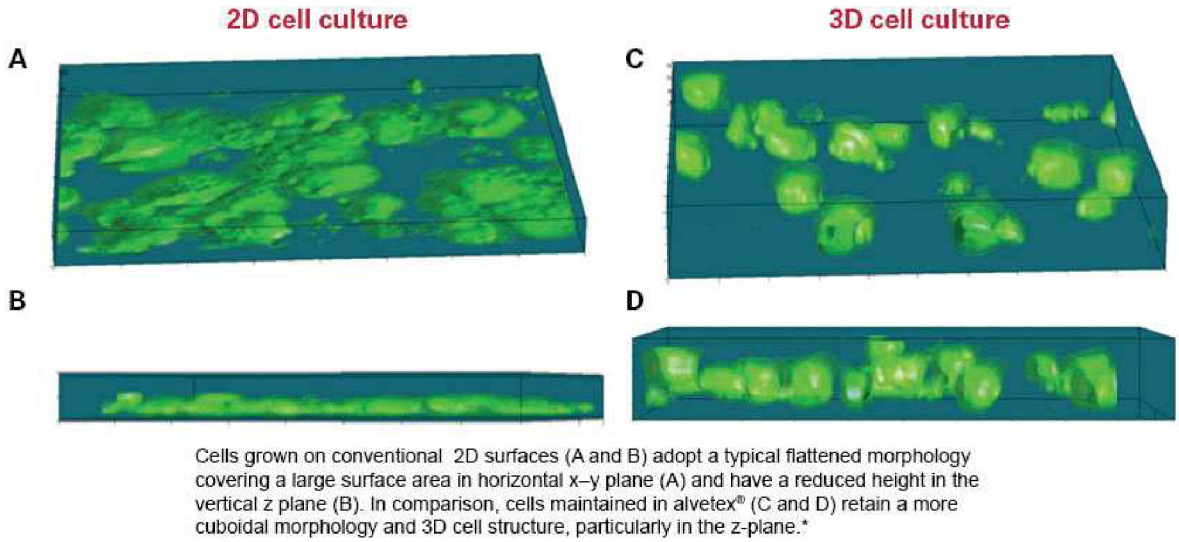
Obrázek 6 Model procesu tvoření multicelulárních sferoidů (MCS): (1) tvorba agregátů z volných buněk vazbami integrin-ECM (2) fáze exprese a akumulace transmembránových proteinů (kadherinů) (3) tvorba kompaktního sferoidu kadherinových vazeb; převzato z (Lin & Chang, 2008)

MCS jsou hojně využívané v onkologii, protože se podobají struktuře tumorů a mohou je napodobovat více než 2D modely. Stejně jako tumory obsahují buňky s obnaženými povrchy i buňky zcela zanořené v agregátu buněk, buňky proliferující i neproliferující a místa s rozdílnou úrovní okysličení (Page et al., 2012). Dále se setkáváme

s jejich využitím v analýzách funkce genů nebo mohou sloužit jako modely pro analýzu interakcí mezi buňkami (Lin & Chang, 2008).

2.2.4 3D modely

Přidání třetí dimenze do životního prostředí buněk vytváří značné rozdíly v chování a charakteristice buněk a také větší podobnost podmínkám v živém organismu. 3D modely tedy zohledňují důležitost buněčných interakcí a strukturu tkáně, což vede k relevantnějšímu výzkumu (Page et al., 2012). Buňky tvořící různé tkáně jsou fyziologicky odlišné, protože jsou vystaveny odlišným koncentracím kyslíku, nutrietů, signálním molekulám a dalším faktorům, jako je teplota, mechanický stres atd. (Derda et al., 2011). 3D kultura se snaží zahrnout komplex souhry několika partnerů, tj. buněk, prostředí, které se podobá ECM, a intersticiální tekutiny, které se nevyskytují v kulturách 2D (Page et al., 2012)(Obrázek 7). Je nutno vzít v úvahu, že takovouto kultivaci ovlivňují i volba materiálu pro oporu buněk („scaffold“), zdroj buněk i metody a podmínky kultivace (Haycock, 2011).



Obrázek 7 Srovnání buněk kultivovaných ve 2D a 3D. Buňky kultivované 2D (A a B): lze pozorovat klasickou plochou morfologii, buňky rostou přilnuté na povrch kultivační nádoby široce do prostoru, zatímco jejich rozložení do vertikální osy je minimální. Buňky kultivované 3D: lze pozorovat buňky v jednom z komerčních „lešení“ zvaném alvetex (C a D), které si uchovávají kubickou morfologii a 3D strukturu buněk. http://www.reinnervate.com/alvetex/science; 1.5.13

V 3D kulturách jsou buňky v kontaktu jedna s druhou, takže téměř celý jejich povrch je vystaven buď povrchu ostatních buněk, nebo prostředí ECM, jejich buňky nekooperují pouze navzájem, ale také s ECM pomocí rozpustných faktorů v intersticiální tekutině a glykoproteinových a peptidoglykanových receptorů. Tato komplexní složitá struktura ovlivňuje diferenciaci, proliferaci a životaschopnost buněk ve 3D modelech, jejich genovou expresi, morfologii i jejich odpovědi na podněty a metabolizaci chemických látek (Page et al., 2012), a tak je přibližuje úrovni mnohem srovnatelnější s *in vivo* situací, než můžeme najít u kterýchkoli jiných *in vitro* modelů.

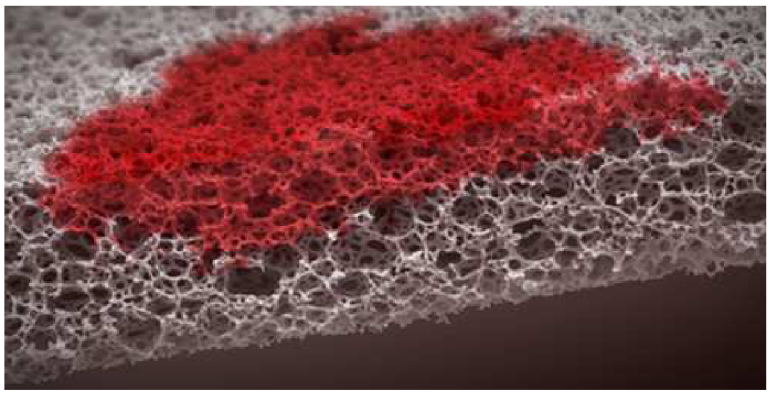
Když si vybíráme *in vitro* model, musíme vzít v úvahu jeho zamýšlené využití. Např. buňky rakoviny prsu rostoucí na Petriho miskách, tedy ve 2D uspořádání, jsou usmrceny již relativně nízkými dávkami chemoterapeutik nebo radiace. Pokud tyto samé buňky kultivujeme v 3D, jsou vůči stejným dávkám chemoterapeutik či radiace rezistentní, stejně tak jako rakovinné buňky v lidském těle (Page et al., 2012). Z tohoto plyne, že 3D modely jsou např. pro testování a vývoj nových léčiv vhodnější a validnější. Existují i mnohé další studie potvrzující fakt, že 3D modely jsou bližší situaci *in vivo*. Např. jedna potvrzuje, že hydrogely mechanicky a biochemicky upravené pro kultivaci mezenchymových kmenových buněk (MSCs) a buněk hladké svaloviny (SMCs) tak, že jim zajišťují vysokou životaschopnost, schopnost se rozprostřít v prostoru a dlouhodobou kultivaci. Studie se zaměřovala na buněčnou proliferační kapacitu a na regulaci fenotypově specifických proteinů a integrinových podjednotek ve srovnání s kultivací stejných buněk v 2D prostředí. Kromě jiných parametrů se ukázalo, že oba typy buněk reagovaly na 3D kultivaci rozdílně. Zatímco MSCs rostly v 3D kultuře výrazně pomaleji než ve 2D podmínkách, což bylo pravděpodobně způsobeno jejich přechodem buněk do klidového stavu, SMCs kultura rostla ve 3D rozměru zpočátku pomaleji než její 2D protějšek ale její růst se postupně zvyšoval. Buňky 3D kultury rovněž vykazovaly rozdíly v produkci SMCs-specifických proteinů jako je myosin a αSMA. Výsledky tak ukazují významné změny vlastností obou buněčných kultur v případě 3D kultivace, které by mohly významně ovlivnit výsledky získané na těchto typech buněk *in vitro* (Adelow, Segura, Hubbell, & Frey, 2008).

Další studie v rámci testování hepatotoxicity poukazuje na to, že hepatocyty kultivované v kolagenovém gelu v 3D podmínkách bez séra přežívaly déle (až 3 týdny), než když je kultivujeme v 2D prostředí (5 dnů). V 3D kultivaci tedy nedocházelo k předčasnému stárnutí buněk a po dlouhý časový úsek byla zaznamenávána významná jaterní metabolická funkce. Na rozdíl od 2D kultivace si také hepatocyty zachovávaly

schopnost reagovat na hormony (Gomez-Lechon et al., 1998). Americká společnost "MB research labs" vyvíjí nové 3D modely lidských tkání pro testování genotoxicity, fototoxicity, oční a kožní iritace atd. Některé z nich už jsou ve stádiu validace v rámci ECVAM. Mezi takovéto modely se řadí např. organotypický *in vitro* 3D tkáňový model lidských epiteliálních buněk z rohovky (HCE) pro testování okulární toxicity a náhradu příslušných *in vivo* testů (Klausner et al., 2000). V současné době se také vyvíjí mnoho 3D modelů pro testování dermální toxicity. Komerčně dostupné 3D modely pokožky nahrazují *in vivo* metody v testování toxicity a účinků jak pro preklinické, tak regulační účely (Wever, Petersohn, & Mewes, 2013).

2.2.5 „Lešení" („Scaffold")

V 3D kultivaci se buňky nenechávají růst jen po kultivačním povrchu, ale vrůstají do porézního biokompatibilního trojrozměrného prostředí, tzv. „lešení", v anglickém originále zvaném „scaffold" (Haycock, 2011), které jim imituje prostředí tkáně *in vivo*, resp. jim umožňuje to, že si kromě toho, že nabývají přirozený tvar a strukturu, samy mohou zajistit přirozenou tkáňovou organizaci jako v podmínkách *in vivo*. Hlavním cílem opory buněk neboli „lešení" (Obrázek 8), je vytvořit podmínky přirozeně se nacházející v ECM, nezbytné pro fungování živé buňky. Zvolený design ovlivňuje vlastnosti 3D modelu v makro-, mikro- a nano- měřítku (Haycock, 2011).



Obrázek 8 Biokompatibilní porózní „lešení" Alvetex využívané k 3D kultivaci buněk; http://www.bio-equip.cn/ensrc.asp?ID=2150**,** 30.4.2013

Makro-měřítka jsou důležitá pro určování celkové velikosti a tvaru podpůrné struktury („lešení"). Pokud jsou metody „lešení" využity pro klinické účely, pak řada z tvarů může být potřebná pro implantaci do defektního místa. „Lešení" mohou být tedy vyráběna jako modely pro chybějící místo ve tkáni. (Haycock, 2011). Toto se týká především tkáňového inženýrství.

Charakterizace „lešení“ v mikro-měřítku ovlivňuje architekturu tkáně a její celkové mechanické vlastnosti. Mikrostrukturální znaky v obecném pojetí jsou důležité pro zajištění buněčné adheze. Musí umožňovat rovnováhu mezi strukturální porozitou a objemem zabraným buňkami, aby se zachoval efektivní transport signálních molekul a živin i odvod odpadních produktů (Haycock, 2011).

Tuhost podpůrného materiálu může ovlivňovat nebo dokonce určovat diferenciaci kmenových buněk bez přítomnosti jakýchkoli vnějších sil (Haycock, 2011). Mezi materiály používané k výrobě „lešení“ řadíme kovy, sklo, keramiku a polymery – ty jsou používány hlavně z toho důvodu, že známe jejich chemické a strukturní vlastnosti a také proto, že se dají snadno vyrobit. Jde o syntetické deriváty jako PGA („poly glycolic acid“) a PLA („poly lactic acid“) nebo přírodní deriváty jako například chitosan, kyselina hyaluronová nebo kolagen (Haycock, 2011; Takei, 2006).

Vlastnosti „lešení“ v nano-měřítku jsou důležité pro to, jak buňky fyzicky interagují se substrátem a jak na něj odpovídají. Precizní zvládnutí těchto struktur je důležité pro události nastávající na molekulární úrovni (Haycock, 2011). Jedním z komerčně dostupných produktů je např. houbovitá polystyrenová struktura zvaná Alvetex (Obrázek 8) umožňující jednoduchou a rutinní 3D kultivaci podobnou kultivaci 2D, neboť je dodáván v takové formě, aby byl kompatibilní se standardními analytickými metodami, např. s různými typy mikrodestiček. Ke kultivaci se mohou používat média běžně užívaná v kultivaci 2D. Je stabilní a inertní, umožňuje tedy i dlouhodobou kultivaci (ALVETEX, 2012).

3. Závěr

Testování na živých organismech je v dnešní době stále více využívaným způsobem stanovování toxicity chemických látek a v některých případech zatím i jedinou možností, jak prokázat jejich nebezpečnost. V rámci principu 3R se však věda snaží o zvýšení relevance *in vitro* testů vůči situaci *in vivo* pomocí nahrazování klasických jednovrstevných *in vitro* modelů, které příliš nereprezentují prostředí v živých organizmech, vývojem nových metod a materiálů kultivace buněčných kultur *in vitro*, upravováním podmínek kultivace, snahou o vytváření 3D podmínek náhradou extracelulární matrix nebo použitím podpůrných struktur. Tato práce shrnuje nové trendy v testování *in vitro* včetně několika příkladů praktického využití i v toxikologii či v humánní medicíně. Pokusila jsem se v ní také o srovnání s tradičními a

standardizovanými metodami testování toxicity a o vyjasnění alespoň zásadních výhod a nevýhod jednotlivých modelů.

B. Experimentální část

1. Teorie

Cílem experimentu bylo ověřit možnost studia parakrinní komunikace buněk samčího rozmnožovacího systému *in vitro.* Experiment ko-kultivace probíhal s Leydigovými (TM3) a Sertoliho (TM4) buňkami, nerakovinnými netransformovanými buňkami izolovanými z varlat nedospělého samce myši. Oba typy buněk mají morfologii a hormonální vlastnosti podobné rezidentním buňkám *in situ* (Mather, Zhuang, Perez-Infante, & Phillips, 1982). Leydigovy buňky, nacházející se vmezeřeně v intersticiu mezi semenotvornými kanálky, představují hlavní endokrinní složku varlat. Primární sekreční produkt těchto buněk je testosteron a jiné androgeny. Sertoliho buňky lemují bazální membránu semenotvorných kanálků a vzájemně tvoří těsná spojení. V odpovědi na testosteron nebo folikuly stimulující hormon (FSH) secernují protein vázající androgeny (ABP) (Blahoš & Zmrazil, 2006). Je prokázáno, že tyto typy buněk vzájemně parakrinně komunikují. Jak se tato komunikace projeví na růstu buněk, se snažil objasnit *in vitro* experiment. U buněk byl po celou dobu expozice sledován jejich růst pomocí přístroje zaznamenávajícího impedanci buněčné kultury v každé jamce speciální 96-jamkové mikrodesky. V polovině desky byl sledován růst kultury TM3 vystavené stoupajícímu počtu buněk linie TM4 kultivované v insertu, který obě linie odděloval propustnou membránou zamezující fyzickému kontaktu buněk. V druhé polovině desky byl sledován vliv stoupajícího počtu buněk linie TM3 v insertu na růstové charakteristiky linie TM4 pěstované na dně desky. Pro větší přiblížení podmínkám *in vivo* byly všechny kultivační povrchy potaženy Matrigelem. Je známo, že obě buněčné linie jsou citlivé na steroidní hormony. Abychom ověřili vliv hormonů přítomných v kultivačním médiu, byl experiment proveden ve dvou médiích – médium I je kompletní s 5% koňského i 2,5% fetálního bovinního séra a médium II se 7,5% sérem u kterého byl pomocí inkubace s aktivním uhlím snížen obsah steroidních hormonů.

1. Materiál a metody

Chemikálie

1. BD MatrigelTM hESC-qualified Matrix: firma BD, Kat. č. 354227, Lot č. 2167738; Ředicí faktor: 330 µl na 25 ml media (specifický pro každý Lot., založen na proteinové koncentraci)
2. Kultivační médium I (pro obě linie stejné): Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium and Ham´s F12 with 15 mM HEPES and sodium bicarbonate (500 ml; Sigma, Kat. Č. D6421) + 5% koňské sérum (27.4 ml; PAA, Kat. Č. B15-021) + 2,5% fetální bovinní sérum (13.7 ml; Sigma, Kat. Č. F6178) + 2,5mM L-glutamin (6,8 ml; Sigma, Kat. Č. G7513)
3. Kultivační médium II (pro obě linie stejné): Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium and Ham´s F12 with 15 mM HEPES and sodium bicarbonate (500 ml; Sigma, Kat. Č. D6421) + 7.5% fetální bovinní sérum třepané s aktivním uhlím („Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum“)
4. Trypsin – 0,25% w/v roztok trypsinu s EDTA (PAA, Kat. Č. L11-003)
5. PBS - pufrovaný fyziologický roztok (1 l), pH 7,2: 137mM NaCl – 8 g, 2,7 mM KCl – 0,2 g, 8 mM Na_2HPO_4 . $12H_2O$–2.89 g, 1,47 mM KH_2PO_4 – 0,2 g; pH 7,2
6. Methylénová modř (Sigma-Aldrich, Kat. Č. M9140)

Buněčné linie

7. TM3 buňky - samčí Leydigovy buňky izolované z varlat nedospělé myši (*Mus musculus*) kmene BALB/c nu/+, optimální ředění pro kultivaci 1:10 až 1:100 (zakoupeny z ATCC- „American Type Culture Collection“, kat. č. CRL-1714™), doba zdvojení (tzv. „doubling time“) - 18 až 22 h. (závislá na koncentraci nasazených buněk $0,4\times10^6$-$1,8\times10^6$ b./cm^2)
8. TM4 buňky - samčí Sertoliho buňky izolované z varlat nedospělé myši (*Mus musculus*) kmene BALB/c nu/+, optimální ředění pro kultivaci 1:20 až 1:50 (zakoupeny z ATCC- American Type Culture Collection kat. č. CRL-1715™), doba zdvojení (tzv. „doubling time“) - 16 až 24 h. (závislá na koncentraci nasazených buněk $0,4\times10^6$-$1,8\times10^6$ b./cm^2)

Pomůcky

9. E-plate 96: firma ACEA, kat. č. 05232376001, průměr: 5 mm, povrch: 19,63 mm^2
10. E-plate insert 96 s póry o velikosti 0,4 µm: ACEA, kat.č. 06 465 412 001, lot. č. 20130170, efektivní povrch membrány: 5,88-4,79 mm^2

11. sterilní kultivační nádoby, zkumavky, vaničky, sterilní pipety a mikropipety, sterilní plastové Pasteurovy pipety

Přístroje

12. Biohazardní box s laminárním prouděním
13. Inkubátor (37°C/5% CO_2)
14. Cellometr, firma Nexcelom
15. Přístroj xCELLIgence, firma ACEA
16. Mikroskop Axio Observer Z1, firma Zeiss

2. *Postup*

Pokrytí dna jamek E-desky a insertů Matrigelem

1. Nechali jsme roztát Matrigel ponořený do ledu při 4°C přes noc.
2. Sterilně jsme alikvotovali kapalný Matrigel po 100 µl do vychlazených sterilních zkumavek. Ujistili jsme se, že je Matrigel opravdu úplně kapalný bez gelových shluků. Před pipetováním jsme Matrigel pokaždé dobře promíchali. Alikvoty jsme ihned mrazili na -80°C, kde je stabilní 6-12 měsíců. Je třeba omezit opakované tání a zamražení jednotlivých alikvotů.
3. Jeden alikvot (100 µl) jsme přidali do 7,6 ml bezsérového DMEM/F-12 média vychlazeného na 4°C.
4. Napipetovali jsme 40 µl Matrigelu v médiu na jamku E-desky a 10 µl Matrigelu v médiu na insert. Vše jsme dělali na ledu vychlazenými nástroji. Nechali jsme kapalinu dobře rozprostřít po dně, aby pokryla celý povrch bez bublin.
5. E-desku a insert pokryté Matrigelem jsme nechali inkubovat 2 hod při pokojové teplotě (RT, 15-25°C).
6. Bezprostředně před použitím E-desky i insertu jsme sterilně odsáli zbytek kapaliny.

Nasazení buněk do E-desky a do insertů

1. Napipetovali jsme 50 µl kultivačního media I vytemperovaného na 37°C do jedné poloviny jamek na E-desce a 50 ul kultivačního media II vytemperovaného na 37°C do druhé poloviny jamek na E-desce a nechali jsme desku aklimatizovat při RT asi 20 min.
2. Vložili jsme E-desku do jednotky RTCA SP Station přístroje xCELLigence umístěné v inkubátoru (37°C/5% CO_2) a změřili pozadí ("background measurement") kliknutím na ikonu "Start" v kroku 1 ("Step #1").
3. Pasážovali jsme obě linie dle příslušné SOP následnými kroky:
4. Médium jsme vytemperovali na 37 °C ve vodní lázni a při pokojové teplotě nechali roztát zmražený trypsin.

5. Zkontrolovali jsme pod mikroskopem buňky, zda nejsou kontaminované a jeví se v pořádku, a dále již s nimi pracovali sterilně v biohazardním boxu.
6. Z lahve s buňkami jsme odsáli staré médium a následně opláchli 2x 3ml PBS
7. Do lahve s buňkami jsme napipetovali 1ml trypsinu pro jejich oddělení ode dna kultivační nádoby a na 3 minuty přenesli do inkubátoru.
8. Do nových kultivačních nádob jsme si připravili kultivační média (médium I a médium II).
9. Ověřili jsme, že se buňky oddělily ode dna kultivační nádoby a následně jsme do ní přenesli 3 ml média, abychom inaktivovali aktivitu trypsinu, buňky jsme rozsuspenzovali.
10. Pasážovali jsme buňky v poměru 1:6.
11. Spočítali jsme koncentraci buněk v získané suspenzi pomocí přístroje CELLOMETER.
12. Přidali jsme 50 µl suspense buněk (označují se jako tzv. cílové buňky) do každé jamky E-desky o finální koncentraci 10000 buněk na jamku.
13. Přidali jsme 50 µl suspense buněk (označují se jako tzv. efektorové buňky) do každé jamky insertu o finální koncentraci 0; 938; 1875; 3750; 7500; 15000; 30000 buněk na jamku.
14. Nechali jsme aklimatizovat E-desku i insert při pokojové teplotě po dobu 30 min.
15. Vložili jsme E-desku s cílovými buňkami do jednotky RTCA SP Station přístroje xCELLigence umístěné v inkubátoru (37°C/5% CO_2) a začali monitorovat přisedání a proliferaci cílových buněk. Nechali jsme měřit impedanci v intervalech po 15 min po dobu 2 hod a následně v intervalech 30 min až do ukončení experimentu.
16. Vložili jsme insert s efektorovými buňkami do stejného inkubátoru.
17. Předinkubace buněk v insertu a v E-desce trvala 24 hod.

Vložení inzertu do E-desky

1. Po 24 hod jsme sterilně přenesli E-desku a insert s buňkami do laminárního biohazardního boxu.
2. Sundali víko z E-desky i víko z tzv. "Receiver Plate" u insertu A opatrně odsáli médium a nepipetovali čerstvé médium.
3. Přenesli opatrně insert do E-desky a přikryli E-desku s vloženým insertem víkem z tzv. "Receiver Plate"
4. Přenesli jsme E-desku s insertem přikrytou víkem z insertu zpět do jednotky RTCA SP Station přístroje xCELLigence umístěné v inkubátoru (37°C/5% CO_2) a začali jsme monitorovat cílové buňky nejdříve v intervalu každých 5 min po dobu 2 hod, následně po 30 min až do ukončení experimentu.
5. Na konci experimentu jsme vyndali insert z E-desky, odsáli z něj médium a provedli oplach PBS.
6. Buňky jsme fixovali 70 % EtOH a vystavili je 0,1 % roztoku metylénové modře ve vodě, následně jsme ji odsáli a počkali, až membrány s buňkami v inzertu zaschnou a buňky jsme vyfotili spolu s cílovými buňkami na E-desce.

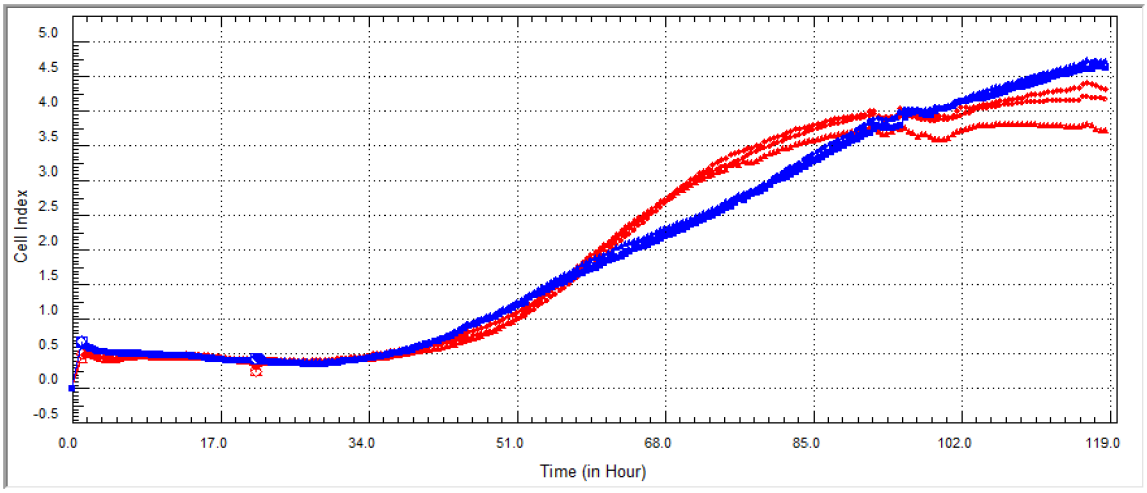
3. Zpracování dat

Přístroj xCELLigence měří impedanci v jamkách speciální E-desky se zlatými elektrodami. Tuto impedanci, která se zvyšuje např. v případě přisedání buněk, změně morfologie či jejich proliferaci a naopak snižuje v případě uvolňování buněk z povrchu či jejich odumírání, zaznamenává ve zvolených časových intervalech a přepočítává na buněčný index, který je charakteristický pro každou buněčnou linii. Buněčný index byl normalizován na poslední měřený čas, než byl přenesen do E-desky insert. V tomto čase mají všechny buněčné indexy hodnotu 1 a ve zbývajících časových intervalech jsou buněčné indexy k nim normalizovány na normalizovaný buněčný index.

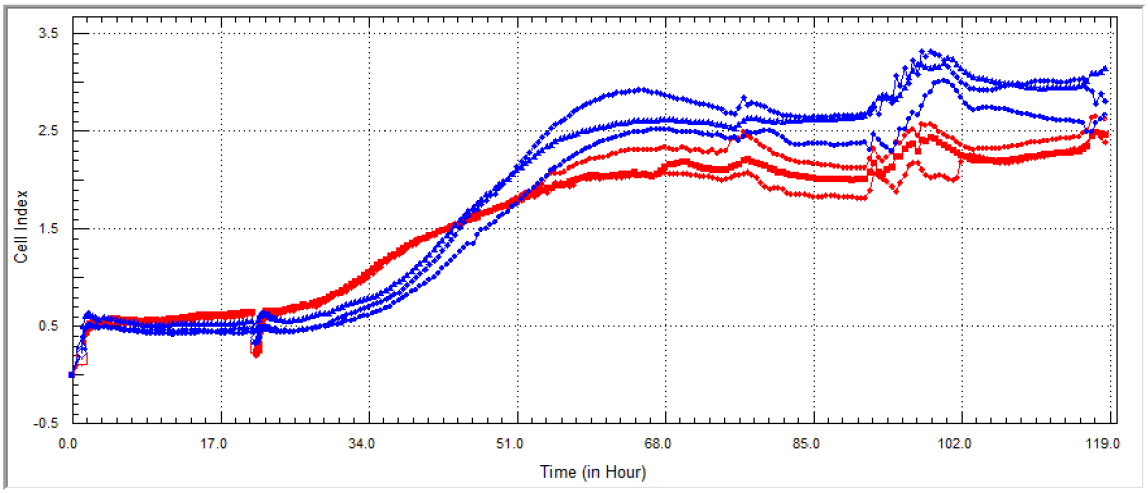
4. Výsledky a Diskuze

Porovnáním růstu samotných Leydigových TM3 buněk v médiu s 5% koňským i 2,5% fetálním bovinním sérem (médium I) a v médiu se sníženým obsahem hormonů (médium II) lze vyčíst, že v médiu I začaly buňky růst exponenciálně po 40 hod, naproti tomu v médiu II přešly z lag fáze do exponenciální dříve, po 36 hod (Obrázek 9A). V exponenciální fázi se v médiu I dělily rychleji (čas zdvojení v médiu I: 12,14±0,23 hod a v médiu II: 19,58±0,46 h). Růstová křivka byla v médiu I v exponenciální fázi strmější, oproti křivce v médiu II. Tedy Leydigovy TM3 buňky rostly v médiu I rychleji, ovšem došlo taky k rychlejšímu přechodu do stacionární fáze (po 85 hod v médiu I a po 119 hod v médiu II). To mohlo být zapříčiněno limitací prostorem nebo živinami.

A.



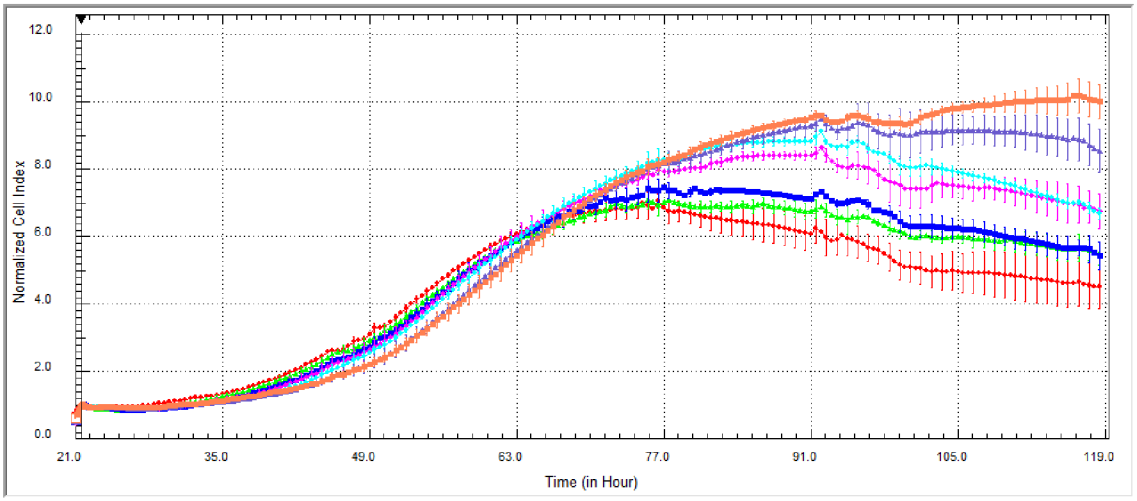
B.



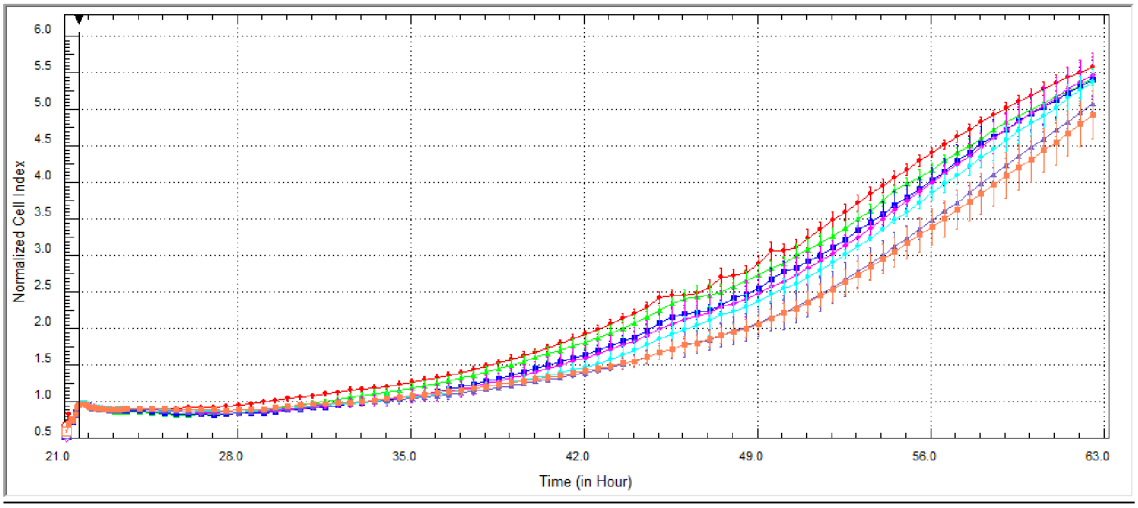
Obrázek 9 Srovnání růstových křivek Leydigových TM3 buněk (A.) a Sertoliho TM4 buněk (B.) bez ko-kultivace na E-desce pokryté Matrigelem v médiu s 5 % koňského a 2,5 % fetálního bovinního séra (*červená*) **a v médiu s 7,5 % fetálního bovinního séra s nižším obsahem hormonů** (*modrá*). Křivky znázorňují změnu tzv. buněčného indexu („Cell index“) v čase zaznamenaného přístrojem xCELLigence pro počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku. Data křivky znázorňují průměr ± SD z triplikátu.

Porovnáním růstu samotných Sertoliho TM4 buněk v médiu s 5% koňským i 2,5% fetálním bovinním sérem (médium I) a v médiu se sníženým obsahem hormonů (médium II) lze vyčíst (Obrázek 9B), že v médiu I začaly buňky růst exponenciálně po 24 hod, naproti tomu v médiu II přešly z lag fáze do exponenciální o něco později, po 27 hod. V exponenciální fázi se v médiu I dělily rychleji (čas zdvojení v médiu I: 17.68±0.047 h a v médiu II: 11.92±0.16h). Růstová křivka byla v médiu I v exponenciální fázi méně strmá, oproti křivce v médiu II. Tedy Sertoliho TM4 buňky rostly v médiu I pomaleji, k přechodu do stacionární fáze došlo současně v obou médiích (po 68 hod).

A.



B.

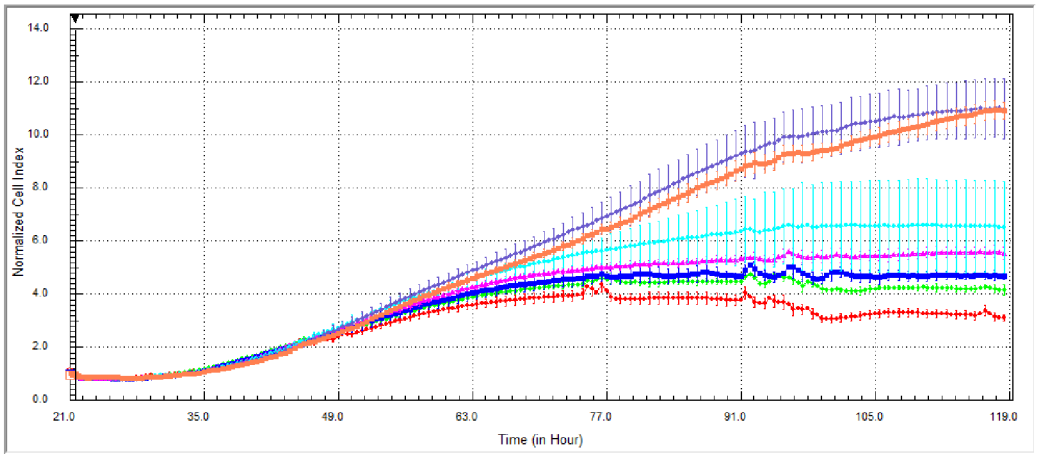


Obrázek 10 Růst Leydigových TM3 buněk v ko-kultivaci se Sertoliho TM4 buňkami v médiu s 5 % koňského a 2,5 % fetálního bovinního séra. Leydigovy buňky rostly na E-desce v počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku. Křivky znázorňují změnu tzv. normalizovaného buněčného indexu („Normalized Cell index“) v čase zaznamenaného přístrojem xCELLigence a to v průběhu od počátku ko-kultivace (tedy od přidání insertu do E-desky v čase 21:40 hod) až do konce ko-kultivace (**A.**) a v průběhu exponenciálního růstu buněk (**B.**). Sertoliho buňky rostly na insertu v počátečních koncentracích: 30 tis. (*červená*), 15 tis (*světle zelená*), 7,5 tis. (*modrá*), 3,75 tis. (*růžová*), 1,88 tis (*tyrkysová*), 0,94 tis (*fialová*) a 0 (*oranžová*) buněk na insert. Data křivek znázorňují průměr ± SD z triplikátu.

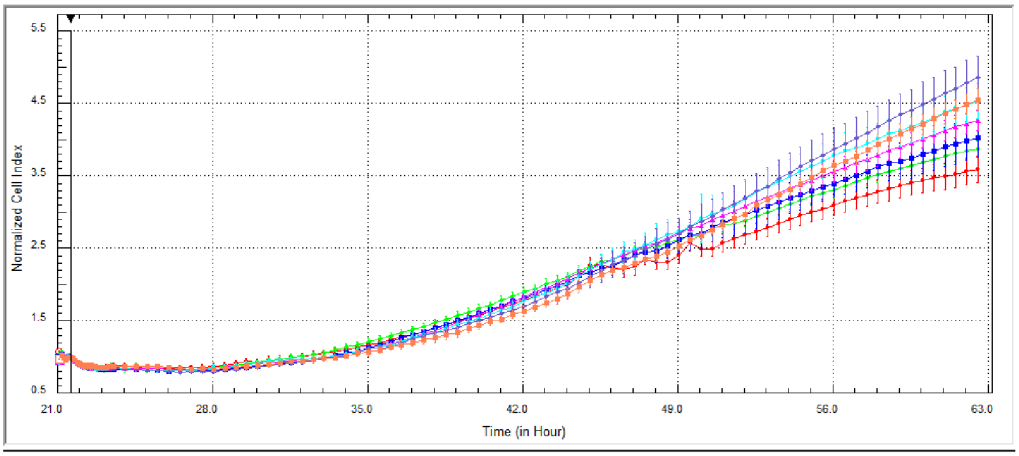
Na růstové křivce Leydigových TM 3 buněk v médiu s 5% koňským i 2,5% fetálním bovinním sérem (médium I) na desce, v počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku, stimulovaném přítomností Sertoliho TM4 buněk na insertu v počátečních koncentracích: 30 tis, 15 tis, 7,5 tis., 3,75 tis., 1,88 tis., 0,94 tis. a 0 buněk na insert (Obrázek 10 B.) pozorujeme nejpozvolnější exponenciální fázi růstu Leydigových TM3 buněk v jamkách bez přítomnosti Sertoliho TM4 buněk na insertu, s vzrůstajícími koncentracemi těchto buněk na insertu se exponenciální část křivky stává postupně strmější, tzn. dochází k rychlejšímu nárůstu počtu Leydigových TM3 buněk v jamkách

desky. S tím ale souvisí i rychlejší přechod do stacionární fáze, potažmo do fáze odumírání, při vyšších koncentracích Sertoliho TM4 buněk na insertu, zřejmě v důsledku nedostatku živin či prostoru (Obrázek 10A.). Je tedy jasné, že čím strmější je exponenciální fáze křivky (čím více je proliferace Leydigových TM3 buněk stimulovaná), tím rychleji se překlenuje do fáze stacionární a do fáze odumírání.

A.



B.

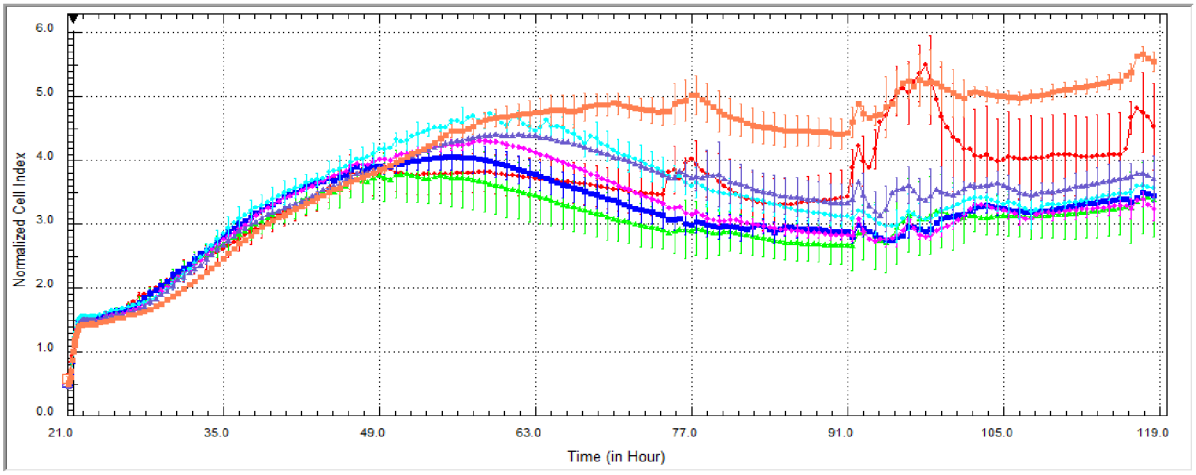


Obrázek 11 Růst Leydigových TM3 buněk v ko-kultivaci se Sertoliho TM4 buňkami v médiu s 7,5 % fetálního bovinního séra s nižším obsahem hormonů. Leydigovy buňky rostly na E-desce v počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku. Křivky znázorňují změnu tzv. normalizovaného buněčného indexu („Normalized Cell index“) v čase zaznamenaného přístrojem xCELLigence a to v průběhu od počátku ko-kultivace (tedy od přidání insertu do E-desky v čase 21:40 hod) až do konce ko-kultivace (**A.**) a v průběhu exponenciálního růstu buněk (**B.**). Sertoliho buňky rostly na insertu v počátečních koncentracích: 30 tis. (*červená*), 15 tis (*světle zelená*), 7,5 tis. (*modrá*), 3,75 tis. (*růžová*), 1,88 tis (*tyrkysová*), 0,94 tis (*fialová*) a 0 (*oranžová*) buněk na insert. Data křivek znázorňují průměr ± SD z triplikátu.

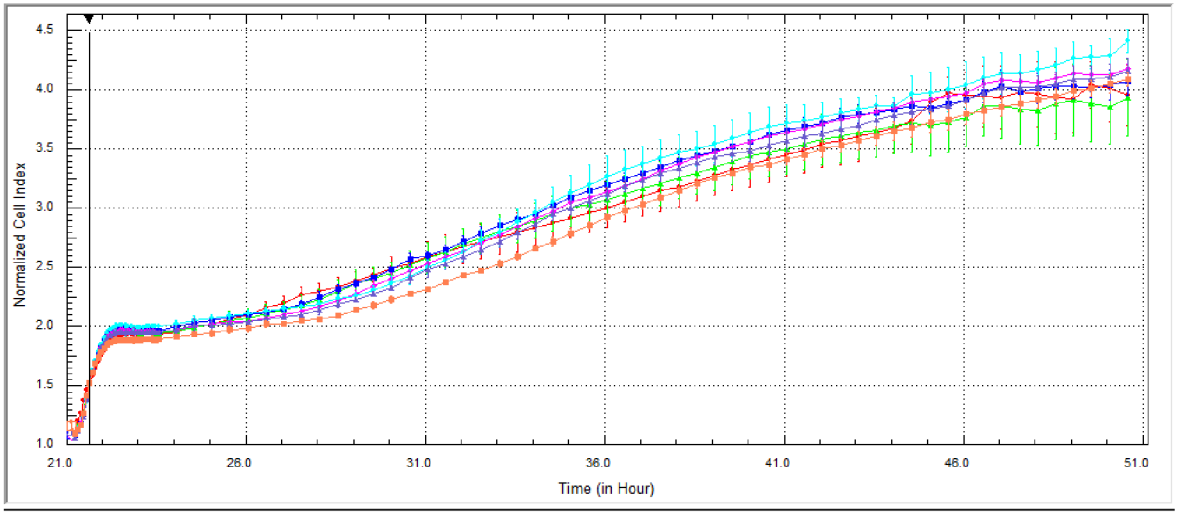
Na růstové křivce Leydigových TM 3 buněk v médiu se sníženým obsahem hormonů (médium II) na desce, v počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku, stimulovaném přítomností Sertoliho TM4 buněk na insertu v počátečních koncentracích: 30 tis, 15 tis, 7,5 tis., 3,75 tis., 1,88 tis., 0,94 tis. a 0 buněk na insert (Obrázek 11B.) pozorujeme obecně pozvolnější exponenciální fázi růstu oproti médiu I. Nejpozvolnější

exponenciální fázi růstu a současně i nejrychlejší přechod do stacionární fáze Leydigových TM3 buněk pozorujeme v jamkách, v nichž se nacházely nejvyšší počáteční koncentrace Sertoliho TM4 buněk na insertu. Zde se oproti médiu I naopak s klesajícími koncentracemi těchto buněk na insertu exponenciální část křivky postupně prodlužuje a do stacionární fáze přechází později (Obrázek 11A.). Můžeme tedy předpokládat, že v případě média II spolu vzájemně Leydigovy TM3 a Sertoliho TM4 buňky spíše kompetují o živiny v médiu, neboť čím více bylo na začátku experimentu Sertoliho TM4 buněk na insertu, tím méně proliferovaly a následně rychleji odumíraly Leydigovy TM3 buňky v jamkách.

A.



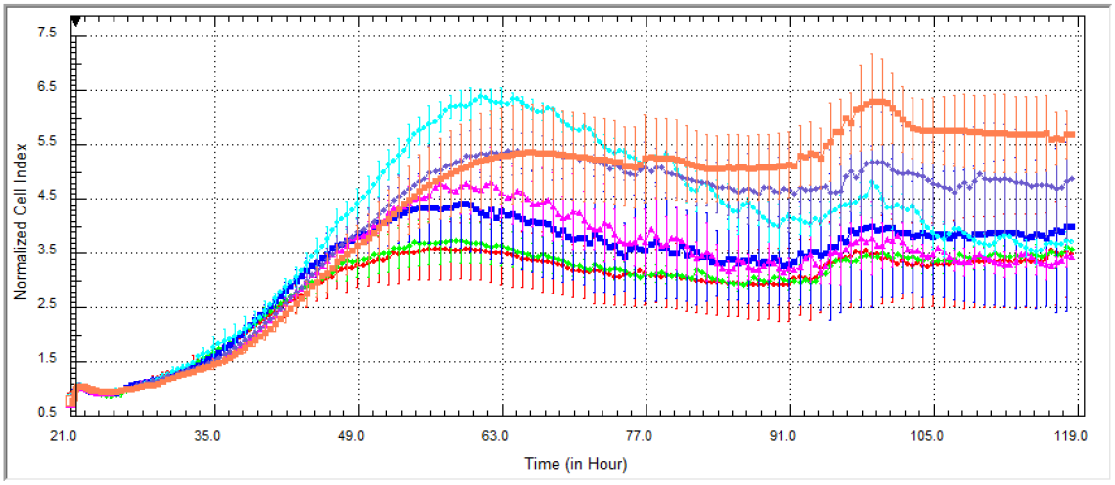
B.



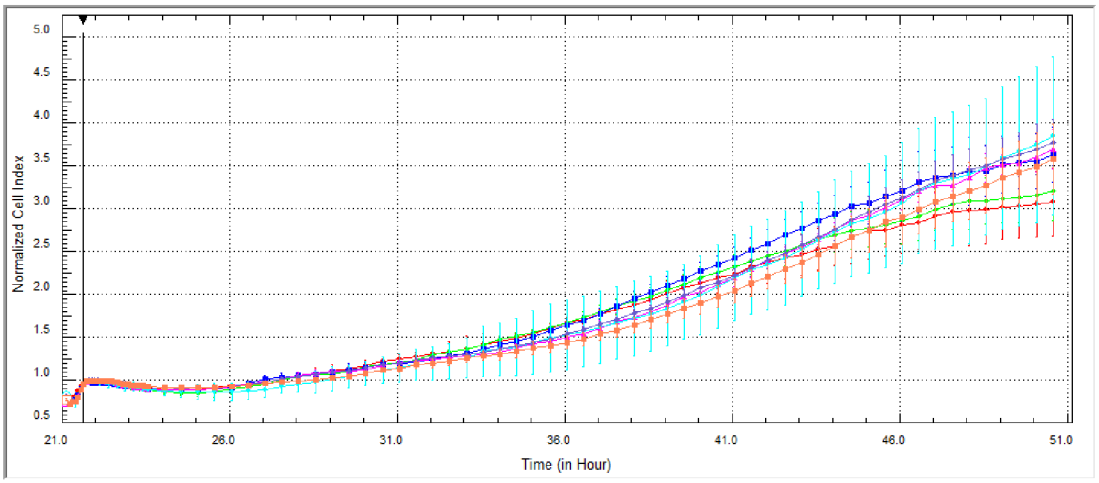
Obrázek 12 Růst Sertoliho TM4 buněk v ko-kultivaci s Leydigovými TM3 buňkami v médiu s 5 % koňského a 2,5 % fetálního bovinního séra. Sertoliho buňky rostly na E-desce v počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku. Křivky znázorňují změnu tzv. normalizovaného buněčného indexu („Normalized Cell index“) v čase zaznamenaného přístrojem xCELLigence a to v průběhu od počátku ko-kultivace (tedy od přidání insertu do E-desky v čase 21:40 hod) až do konce ko-kultivace (**A.**) a v průběhu exponenciálního růstu buněk (**B.**). Leydigovy buňky rostly na insertu v počátečních koncentracích: 30 tis. (*červená*), 15 tis (*světle zelená*), 7,5 tis. (*modrá*), 3,75 tis. (*růžová*), 1,88 tis (*tyrkysová*), 0,94 tis (*fialová*) a 0 (*oranžová*) buněk na insert. Data křivek znázorňují průměr ± SD z triplikátu.

Na růstové křivce Sertoliho TM4 buněk v médiu s 5% koňským i 2,5% fetálním bovinním sérem (médium I) na desce, v počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku, v přítomnosti Leydigových TM3 buněk na insertu v počátečních koncentracích: 30 tis, 15 tis, 7,5 tis., 3,75 tis., 1,88 tis., 0,94 tis. a 0 buněk na insert (Obrázek 12B.) pozorujeme exponenciální fázi růstu Sertoliho TM4 buněk poměrně rovnoměrnou ve všech jamkách bez ohledu na přítomnost Leydigových TM3 buněk na insertu. Přechod do stacionární fáze, potažmo do fáze odumírání, nastává v čase 51 hod. Následný průběh růstových křivek (Obrázek 12A.) je opět podobný, významně se liší pouze v případě samotných Sertoliho TM4 buněk v jamkách, bez přítomnosti Leydigových TM3 buněk na insertu. Stacionární fáze v jejich případě má pozvolnější ráz což by se dalo vysvětlit tím, že nemusely kompetovat o živiny v médiu, tudíž vydržely pravděpodobně ve větším počtu a déle než v ostatních jamkách za přítomnosti Leydigových TM3 buněk na insertu. Zvláštního artefaktu si můžeme všimnout u křivky jamek s nejvyšší koncentrací Leydigových TM3 buněk na insertu, o jehož příčině by se však dalo jen spekulovat.

A.



B.



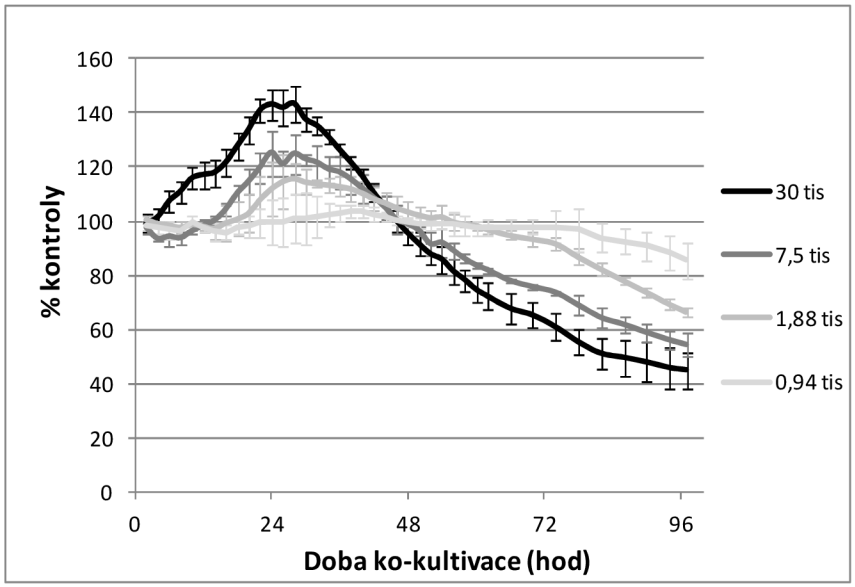
Obrázek 13 Růst Sertoliho TM4 buněk v ko-kultivaci s Leydigovými TM3 buňkami v médiu s 7,5 % fetálního bovinního séra s nižším obsahem hormonů. Sertoliho buňky rostly na E-desce v počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku. Křivky znázorňují změnu tzv. normalizovaného buněčného indexu („Normalized Cell index“) v čase zaznamenaného přístrojem xCELLigence a to v průběhu od počátku ko-kultivace (tedy od přidání insertu do E-desky v čase 21:40 hod) až do konce ko-kultivace (**A.**) a v průběhu exponenciálního růstu buněk (**B.**). Leydigovy buňky rostly na insertu v počátečních koncentracích: 30 tis. (*červená*), 15 tis (*světle zelená*), 7,5 tis. (*modrá*), 3,75 tis. (*růžová*), 1,88 tis (*tyrkysová*), 0,94 tis (*fialová*) a 0 (*oranžová*) buněk na insert. Data křivek znázorňují průměr ± SD z triplikátu

Na růstové křivce Sertoliho TM4 buněk v médiu se sníženým obsahem hormonů (médium II) na desce, v počáteční koncentraci 10000 buněk na jamku, v přítomnosti Leydigových TM3 buněk na insertu v počátečních koncentracích: 30 tis, 15 tis, 7,5 tis., 3,75 tis., 1,88 tis., 0,94 tis. a 0 buněk na insert pozorujeme velmi pozvolnou exponenciální fázi růstu Sertoliho TM4 buněk poměrně rovnoměrně ve všech jamkách bez ohledu na přítomnost Leydigových TM3 buněk na insertu (Obrázek 13B.). Přechod do stacionární fáze, potažmo do fáze odumírání, nastává v čase 51 hod a následný průběh růstových křivek (Obrázek 13A.) je ve srovnání s médiem I poněkud rozmanitější, výrazně se liší

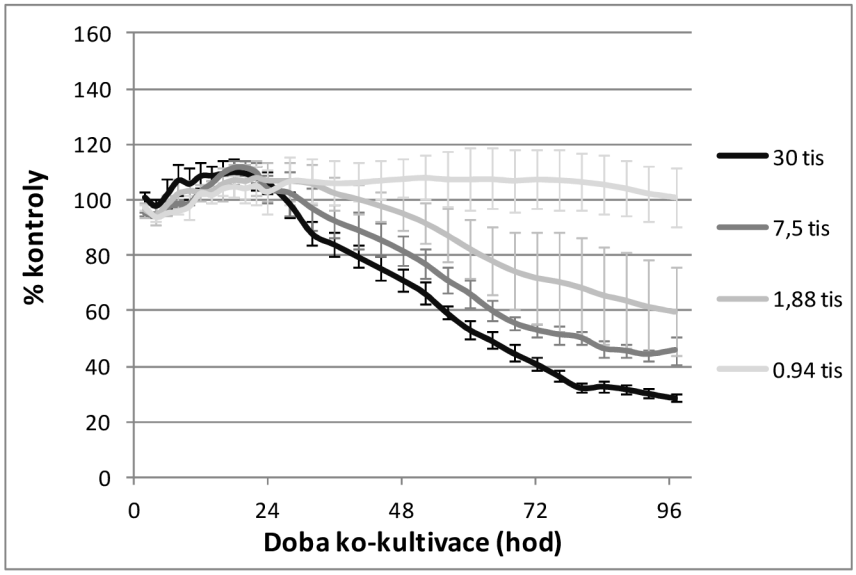
v případě samotných Sertoliho TM4 buněk na desce a ještě u dvou nejnižších koncentrací Leydigových TM3 buněk na insertu - z křivek je patrné, že buňkám se lépe daří, mají k dispozici více prostoru i živin po delší dobu.

Obrázek 14 pracuje s normalizovanými zprůměrovanými daty z triplikátu v % ± SD od kontroly (varianta, kdy na insert nebyly přidány žádné buňky). Na Obrázek 14 A. vidíme, že čím větší koncentrace Sertoliho TM4 buněk byla na insertu, tím více byl stimulován růst Leydigových TM3 buněk médiu s 5 % koňského séra a s 2,5 % fetálního bovinního séra, pokud jsou v exponenciální fázi růstu a to až na 140 % kontroly při koncentraci 30000 Sertoliho TM4 buněk/ml. Se snižující se koncentrací buněk na insertu klesala i stimulace. V Obrázek 14B. můžeme sledovat stejnou situaci avšak v v médiu se 7,5 % fetálního bovinního séra s nižším obsahem hormonů a konstatovat, že je to právě i médium, resp. obsah steroidních hormonů v médiu, které ovlivňuje chování buněk a jejich možnost komunikace, což jsme také v experimentu chtěli ověřit.

A.



B.

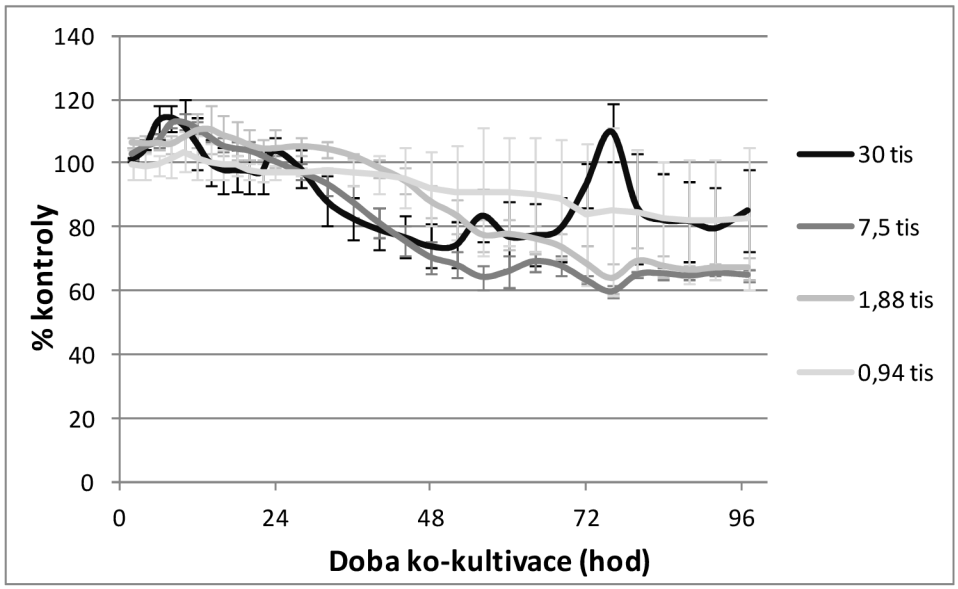


Obrázek 14 Závislost růstu Leydigových TM3 buněk na počtu nasazených Sertoliho TM4 buněk na insert v jejich ko-kultivaci v médiu s 5 % koňského séra a s 2,5 % fetálního bovinního séra (A.) a v médiu se 7,5 % fetálního bovinního séra s nižším obsahem hormonů (B.). Data jsou vyjádřená jako % kontroly, což je varianta, kdy na insert nebyly přidány Sertoliho buňky. Data křivky znázorňují průměr ± SD z triplikátu.

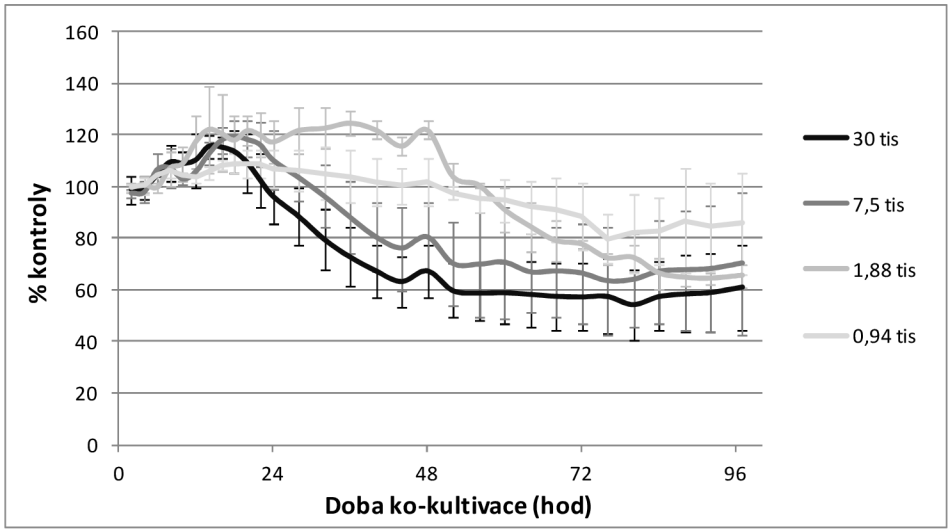
Obrázek 15 pracuje s normalizovanými zprůměrovanými daty z triplikátu v % ± SD od kontroly (varianta, kdy na insert nebyly přidány žádné buňky). Obrázek 15 A. znázorňuje průběh růstu Sertoliho TM4 buněk v souvislosti s koncentrační řadou Leydigových TM3 buněk na insertu v médiu s 5 % koňského séra a s 2,5 % fetálního bovinního séra (médium I), který nebyl významně stimulován ani nejvyšší koncentrací Leydigových TM3 buněk na insertu. V Obrázek 15 B. můžeme sledovat stejnou situaci, avšak v v médiu se 7,5 % fetálního bovinního séra s nižším obsahem hormonů (médium

II), křivky se od varianty v Obrázek 15A. ve svém průběhu sice liší, ale podstatný je fakt, že opět nedocházelo k nijak významné stimulaci tůstu Sertoliho TM4 buněk a to při žádné z koncentrací Leydigových TM3 buněk na insertu.

A.



B.



Obrázek 15 Závislost růstu Sertoliho TM4 buněk na počtu nasazených Leydigových buněk na insert v jejich ko-kultivaci v médiu s 5 % koňského séra a s 2,5 % fetálního bovinního séra (A.) a v médiu se 7,5 % fetálního bovinního séra s nižším obsahem hormonů (B.). Data jsou vyjádřená jako % kontroly, což je varianta, kdy na insert nebyly přidány Sertoliho buňky. Data křivky znázorňují průměr ± SD z triplikátu.

5. Shrnutí praktické části

V experimentální části této práce jsme použili model, který využíval jednu z popsaných technik ko-kultivace na insertu, pro prokázání parakrinní komunikace mezi Leydigovými a Sertoliho buňkami. Z výsledků tohoto experimentu je patrné, že ko-kultivace obou buněčných kultur má vliv na jejich růst a pravděpodobně tedy dochází ke komunikaci mezi oběma kultivačními kompartmenty, podobně jako v živém organismu.

Seznam použité literatury

Abbott, A. (2003). Cell culture: Biology's new dimension. *Nature, 424*(6951), 870-872. doi: 10.1038/424870a

Achilli, T. M., Meyer, J., & Morgan, J. R. (2012). Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy, 12*(10), 1347-1360. doi: 10.1517/14712598.2012.707181

Adelow, C., Segura, T., Hubbell, J., & Frey, P. (2008). The effect of enzymatically degradable poly(ethylene glycol) hydrogels on smooth muscle cell phenotype. *Biomaterials, 29*(3), 314-326.

Atkuri, K., Herzenberg, L., Niemi, A., & Cowan, T. (2007). Importance of culturing primary lymphocytes at physiological oxygen levels. *Proc Natl Acad Sci U S A, 104*(11), 4547-4552.

Bhanushali, M., Bagale, V., Shirode, A., Joshi, Y., & Kadam, V. (2010). An in-vitro toxicity testing - a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*, 15-31.

Blahoš, J., & Zmrazil, V. (2006). *Endokrinologie - interdisciplinární obor*. Praha: TRITON.

Brennan, M., Renaud, A., d'Arros, C., Amiaud, J., Hulin, P., & Layrolle, P. (2012). 3D culture of mesenchymal stem cells on nanofiber PCL and PS meshes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 6*, 197-197.

Brito, C., Simao, D., Pinto, C., Fernandes, P., Serra, M., Schiavo, G., . . . Alves, P. M. (2012). 3D cultures of human neural progenitor cells: dopaminergic differentiation and genetic modification. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 6*, 38-38.

Buschmann, J. (2013). The OECD guidelines for the testing of chemicals and pesticides. *Methods Mol Biol, 947*, 37-56.

Choe, M., Tomei, A., & Swartz, M. (2006). Physiological 3D tissue model of the airway wall and mucosa. *Nat Protoc, 1*(1), 357-362.

Clark, J., Hirstenstein, H., & Gebb, C. (1980). Critical parameters in the microcarrier culture of animal cells. *Dev Biol Stand, 46*, 117-124.

Couceiro, R., Gil, A., Garcia, C., Diaz, P., Couceiro, J., Freire-Garabal, M., & Guitian, F. (2012). Epigenetic modification of beta-catenin in 3D Titania mesenchymal cell cultured scaffolds under variable flux conditions in bioreactor chambers. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 6*, 240-241.

Derda, R., Tang, S., Laromaine, A., Mosadegh, B., Hong, E., Mwangi, M., Whitesides, G. (2011). Multizone Paper Platform for 3D Cell Cultures. *Plos One, 6*(5). doi: 10.1371/journal.pone.0018940

Gao, D., Liu, H., Jiang, Y., & Lin, J.-M. (2012). Recent developments in microfluidic devices for in vitro cell culture for cell-biology research. *Trends in Analytical Chemistry, 35*. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.008

Gomez-Lechon, M., Jover, R., Donato, T., Ponsoda, X., Rodriguez, C., Stenzel, K., Castell, J. (1998). Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *J Cell Physiol, 177*(4), 553-562.

Grindon, C., & Bhogal, N. (2005). The fourth EC report on the statistics of laboratory animal use: trends, recommendations and future prospects. *Altern Lab Anim, 33*(4), 417-426.

Haycock, J. (2011). 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods Mol Biol, 695*, 1-15.

Justice, B., Badr, N., & Felder, R. (2009). 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today, 2009* Jan;14(1-2):102-7

Klausner, M., Osborn, M., Bellavance, K., Breyfogle, B., Kubilus, J., Cerven, D. R., & DeGeorge, G. (2000). The epiocular prediction model: In vivo versus in vitro draize scores for consumer products. Spinnerstown, PA: MatTek Corporation, Ashland, MA and MB Research Laboratories.

kolektiv autorů, Ústav biologie Univerzity Palackého (2012). Praktická cvičení z biologie (pp. 54). Olomouc: Univerzita Palackého.

Langer, R., & Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine.

Lazar, A., Mann, H., Remmel, R., Shatford, R., Cerra, F., & Hu, W. (1995). Extended liver-specific functions of porcine hepatocyte spheroids entrapped in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol Anim, 31*(5), 340-346.

Lapenna, S., Gabbert, S., & Worth, A. (2012). Training needs for toxicity testing in the 21st century: a survey-informed analysis. *Altern Lab Anim, 40*(6), 313-320.

Lee, J., Cuddihy, M., & Kotov, N. (2008). Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev, 14*(1), 61-86.

Lin, R., & Chang, H. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J, 3*(9-10), 1172-1184.

Mather, J., Zhuang, L., Perez-Infante, V., & Phillips, D. (1982). Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium. *Ann N Y Acad Sci, 383*, 44-68.

Mauretti, A., Kossover, O., Sala, A., Ehrbar, M., & Seliktar, D. (2012). Investigating mechanotransduction in 3D culture using different encapsulating hydrogel systems. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 6*, 238-238.

McKim, J., Jr. (2010). Building a tiered approach to in vitro predictive toxicity screening: a focus on assays with in vivo relevance. *Comb Chem High Throughput Screen, 13*(2), 188-206.

Ong, S.-M., Zhang, C., Toh, Y.-C., Kim, S. H., Foo, H. L., Tan, C. H., Yu, H. (2008). A gel-free 3D microfluidic cell culture system. *Biomaterials, 29*(22), 3237-3244. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.022

Page, H., Flood, P., & Reynaud, E. (2012). Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res,* doi:10.1007/s00441-012-1441-5

Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Molecular cell biology,* 8, 839-845.

Romanov, Y. A., Svintsitskaya, V. A., & Smirnov, V. N. (2003). Searching for Alternative Sources of Postnatal Human MesenchymalStem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord (Vol. 21, pp. 105-110). Moscow, Russian Federation: AlphaMed press.

Sedlackova, M., Jaros, J., Barta, T., & Hampl, A. (2012). Understanding cell-to-cell communication in hESCs - creating basis for the move to 3D culture. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 6*, 251-252.

Takei, J. (2006). 3-Dimensionall cell culture scaffold for everyone: Drug screening, Tissue engineering and cancer biology (Vol. 11(3), pp. 170-176). Tokyo, Japan: AATEX.

Wappler, J., Rath, B., Laufer, T., Heidenreich, A., & Montzka, K. (2013). Eliminating the need of serum testing using low serum culture conditions for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell expansion. *Biomed Eng Online, 12*(15), 12-15.

Wever, B., Petersohn, D., & Mewes, K. R. (2013). Overview of human three-dimensional (3D) skin models used for dermal toxicity assessment (Vol. 8). Germany: Household and Personal Care Today.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science,* 318(58), 1917-1920. doi: 10.1126/science.1151526

Zurlo, J., Rudacille, D., & Goldberg, A. M. (1994). Animals and alternatives in testing: History, Science end ethics. New York: Mary Ann Liebert, Inc.

Internetové zdroje:

Gibco 2013. [online]. Cell culture basis: Invitrogen [cit. 2013-05-13]. Dostupné z WWW:< http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/gibco-cell-culture-basics.html?CID=fl-cellculturebasics >

Pincock, S. 2013. [online]. EU plans to cut animal tests. Industry groups pledge to collaborate on refining, reducing, and replacing the use of lab animals. [cit. 2013-04-04] Dostupné z WWW: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/23505/title/EU-plans-to-cut-animal-tests/>

Russel, L. W. M. S., & Burch, R. L. 1959. [online]. The Principles of Humane Experimental Technique. [cit. 2013-02-28]. Dostupné z WWW: < http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc >

Spielmann, H., Goldberg, A. M. 2013 . [online]. *In vitro* methods in toxicology. [cit. 2013-02-28]. Dostupné z WWW: <http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/In%20Vitro%20Methods%20in%20Toxicology/invitro_methods_tox.html>

ALVETEX, 2012. [online]. [cit.2013-05-01]. Dostupné z WWW: <http://www.reinnervate.com/alvetex/science>.

ATLA [online]. [cit.2013-03-01]. Dostupné z WWW: <http://www.frame.org.uk/page.php?pg_id=18>

ECVAM [online]. [cit.2013-03-01]. Dostupné z WWW: <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam>

FRAME [online]. [cit.2013-03-01]. Dostupné z WWW: <http://www.frame.org.uk/>

Ministerstvo životního prostředí [online]. Dostupné z WWW: <http://mzp.cz/cz/news_tz080625reach>

REACH[online]. [cit.2013-03-01]. Dostupné z WWW: <http://reach.cz/index.htm>

Viable alternative, 2013 [online]. Chemistry world [cit. 2013-04-04]. Dostupné z WWW: <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2007/August/Aviablealternative.asp>