In vitro 3D model ľudského trofoblastu

Gašparová P.[1], Bačenková D.[2], Ballová Z.[1], Turcsányiová Z.[1], Sitáš M.[1], Trebuňová M.[2], Dosedla E.[1]

[1] Gynekologicko-pôrodnícka klinika LF UPJŠ, Nemocnica AGEL Košice-Šaca, Slovenská republika
[2] Katedra biomedicínskeho inžinierstva a merania, Strojnícka fakulta, Technická univerzita v Košiciach, Slovenská republika

| Úvod

Bunkové kultúry in vitro sú kľúčové v modelovaní vývoja jednotlivých orgánov a chorôb u ľudí[1]. Hoci konvenčné jednovrstvové bunkové kultúry boli v minulosti veľmi populárne a široko používané, nedostatočná reprezentácia architektúry tkanív a bunkových spojení nedokáže odrážať skutočné biologické procesy in vivo[2]. Organoidy, bunky rastúce v definovanom trojrozmernom (3D) prostredí in vitro za vzniku minizhlukov, ktoré sa samy organizujú a diferencujú na funkčné typy buniek, rekapitulujúc štruktúru a funkciu orgánu in vivo[1], ukázali veľký prísľub pre modelovanie ľudskej fyziológie vďaka schopnosti kmeňových buniek samoorganizovať sa do 3D tkanivových štruktúr[3].

Samoorganizácia v rámci organoidu nastáva prostredníctvom priestorovo obmedzeného záväzku línie a triedenia buniek, čo si vyžaduje aktiváciu rôznych signálnych dráh sprostredkovaných vnútornými bunkovými zložkami alebo vonkajším prostredím, ako je extracelulárna matrix a médiá[1]. Tieto in vitro tkanivá zachytávajú kľúčové mnohobunkové, anatomické a dokonca aj funkčné znaky skutočných orgánov vo veľkosti mikrometrov až milimetrov[4].

Pre úspešné tehotenstvo je nevyhnutný normálny vývoj a funkcia placenty. Hlavné poruchy tehotenstva, medzi ktoré patrí preeklampsia, predčasný pôrod, nevysvetlené narodenie mŕtveho plodu a intrauterinná rastová reštrikcia, majú svoj pôvod v poruche vývoja placenty[5].

Naše súčasné poznatky o ľudskej placente sú obmedzené kvôli nedostatku reprezentatívnych funkčných modelov. Na štúdium placenty sa použilo niekoľko experimentálnych modelov vrátane zvieracích modelov a modelov bunkovej kultúry in vitro, avšak medzi ľudskými a inými zvieracími placentami existujú zreteľné štrukturálne a funkčné rozdiely, teda údaje zo zvieracích modelov nie sú pre ľudí relevantné. In vitro modely ľudských trofoblastov zahŕňajú bunkové línie odvodené z placenty, izolované primárne bunky placenty a explantáty tkaniva ľudskej placenty. Medzi výhody týchto bunkových línií patrí jednoduchosť použitia, neobmedzený prísun materiálu, čistejší zdroj buniek a nižšie náklady na obstaranie. Tieto zdroje obchádzajú niektoré etické obavy spojené s používaním živočíšnych alebo primárnych ľudských tkanív. Nesmrteľné bunkové línie však majú nevýhodu v dôsledku ich malígnych transformácií[6]. Niekoľko bunkových línií bolo vytvorených aj z buniek choriokarcinómu, ale bunky choriokarcinómu majú abnormálny karyotyp[7].

Organoidné štruktúry trofoblastu sú schopné presne rekapitulovať organizáciu placentárnych klkov in vivo, a rovnako vylučovať široké spektrum placentárne špecifických peptidov, hormónov a enzýmov[6].

| Metodika

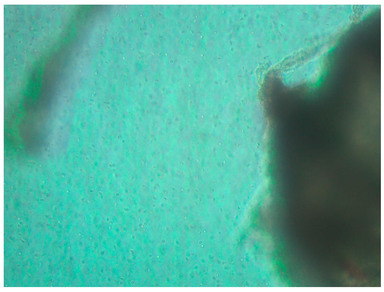
Plodové obaly boli odobrané po ukončení tehotenstva plánovaným císarským rezom od zdravých darkýň s ich informovaným súhlasom. Z časti plodového obalu choriónu boli izolované humánne chorionové mezenchýmové kmeňové bunky (CMSCs) nasledujúcim spôsobom. Placentárne tkanivo bolo spracované v sterilnom prostredí laminárneho boxu. Pomocou chirurgických nástrojov boli oddelené plodové obaly chorión od amniónu. Časť choriónu s veľkosťou približne 10 x 10 cm bola následne premytá v Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM) (Merck, USA) s antibiotikami 100 IU penicilin/mL, 100 µg streptomycin/mL a 0,25 µg amphotericin B/mL (Merck, USA). Časť choriónu bola frakcionovaná na menšie, nepravidelné časti s približnou veľkosťou 1 cm^2. Z fragmentov tkaniva bola izolovaná bunková suspenzia enzymatickým pôsobením. Enzým dispáza II 2,4 U/ml (Merck, USA) pôsobil na tkanivo 15 minút pri 37°C. Po premytí DMEM následne pôsobil na tkanivo enzým kolagenáza II s koncentráciou 1 mg/ml (Merck, USA) 90 minút pri 37°C. Enzým bol odstránený premytím a centrifugáciou. Homogénne natrávené tkanivo bolo filtrované cez bunkové sitko, s veľkosťou pórov 40 µm (BD, Falcon, USA). Výsledná suspenzia izolovaných buniek bola in vitro kultivovaná v odporúčanej koncentrácii 4000 buniek/cm^2 v kultivačnom médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM) (Merck, USA) s 10% bovinným fetálnym sérom (FCS) (Merck, USA) s antibiotikami 100 IU penicilin/mL, 100 µg streptomycin/mL a 0,25 µg amphotericin B/mL (Lonza, USA) v 5% CO_2 atmosfére pri 37°C. Po 4 dňoch kultivácie bolo vymenené kultivačné médium a tým boli odstránené neadherované, prevažne hematopoetické a poškodené bunky. Výsledkom bola kultúru adherovaných mezenchýmových buniek, bez prímesi hematopoetických buniek. Kultivačné médium bolo menené trikrát týždenne. Pasáž buniek bola vykonávaná po dosiahnutí 80% monolayeru CMSCs buniek. Bunková vrstva bola premytá DMEM médiom bez aditív. Po odsatí bolo pridaných 4 ml vytemperovaného trypsínu-EDTA (Merck, USA), ktorý pôsobil na uvoľňovanie buniek 2-5 minútu pri 37°C. Uvoľnené bunky boli odsaté a zbytkový enzým bol neutralizovaný DMEM médiom s 10% FCS. Suspenzia CMSCs buniek bola použitá na ďalšiu pasáž.

| Výsledky

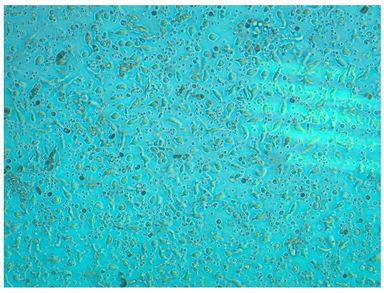
Pri hľadaní alternatívnych zdrojov mezenchymálnych stromálnych buniek sme sa pokúsili preparovať časť ľudskej termínovej placenty a izolovať bunky podobné fibroblastom z fetálnych membrán. Po mechanickom oddelení amniónu od choriónu sa chorión štiepil dispázou a kolagenázou. Kultúry CMSCs boli úspešné, bunky priľnuli do 24 hodín a mohli sa ďalej rozširovať. Choriové bunky boli spočiatku nanesené na 75 cm^2 povrchu kultivačných baniek s hustotou 0,14 x 10^6 jadrových buniek/cm^2. CMSCs priľnuli a proliferovali na podklade tkanivovej kultúry. Adherentné bunky mali heterogénne tvary: väčšina s vretenovitou morfológiou (niektoré bunky vykazujú dendrity) a menšie množstvo vysoko reflexných malých, zaoblených, rýchlo proliferujúcich buniek. Po prvej pasáži bunky expandovali rovnakým monovrstvovým spôsobom s homogénnymi bunkami podobnými fibroblastom.

| Záver

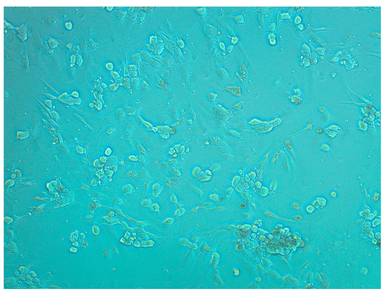
Organoidy umožňujú vytváranie prirodzenej priestorovej bunkovej organizácie, architektúry buniek a sledovanie medzibunkových interakcií. Sú ideálne na skúmanie správania sa ľudských trofoblastov a iných placentárnych buniek, ako aj ich schopnosti reprezentovať fyziologické stavy in vivo a in vitro. In vitro 3D model s charakteristickým fenotypom môže byť veľkým prínosom pre štúdium fyziológie placenty a zároveň poskytuje veľkú podporu pre budúce modelovanie placentárnych ochorení



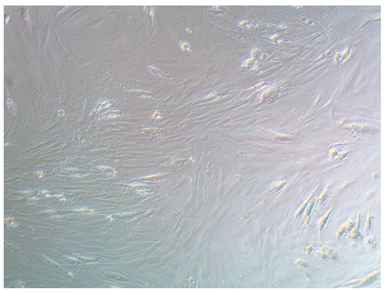
Obr. 1 Tkanivo choriónu pred izoláciou s prímesou erytrocytov



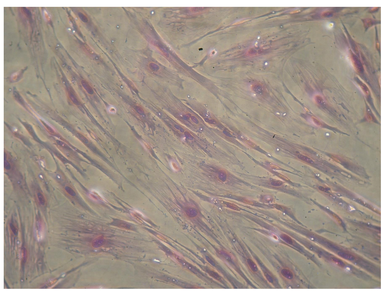
Obr. 2 Zmes buniek izolovaných z plodových obalov z časti chorión, tesne po izolácii



Obr. 3 Adherované choriónové mezenchýmove kmeňové bunky, 4. deň kultivácie, zväčšenie 10x10



Obr. 4 Adherované choriónové mezenchýmove kmeňové bunky vytvárajúce súvislý monolayer, 12. deň kultivácie, zväčšenie 10 x10



Obr. 5 Adherované choriónové mezenchýmove kmeňové bunky, farbenie podľa Giemsa-Romanovského

| Literatúra

1. Corrò C, Novellasdemunt L, Li VSW. A brief history of organoids. Am J Physiol Cell Physiol. 2020 Jul; 319(1): 151–165. 2. Augustyniak J, Bertero A, Coccini T et al. Organoids are promising tools for species-specific in vitro toxicological studies. J Appl Toxicol. 2019 Dec; 39(12): 1610-1622. 3. Wechsler ME, Shevchuk M, Peppas NA. Developing a Multidisciplinary Approach for Engineering Stem Cell Organoids. Ann Biomed Eng. 2020 Jul; 48(7): 1895-1904. 4. Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research. Nat Rev Genet. 2018 Nov; 19(11): 671-687. 5. Sheridan MA, Fernando RC, Gardner L et al. Establishment and differentiation of long-term trophoblast organoid cultures from the human placenta. Nat Protoc. 2020 Oct; 15(10): 3441-3463. 6. Heidari-Khoei H, Esfandiari F, Hajari MA et al. Organoid technology in female reproductive biomedicine. Reprod Biol Endocrinol. 2020 Jun; 18(1): 64. 7. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. Development. 2019 Nov 27; 146(22): dev163428.

SYMPOZIUM AGEL

XVIII. ročník odborného sympozia
3. – 4. 11. 2025

Práca je podporená grantom Vega 1/0387/22 Názov: Vývoj a testovanie systémov pre riadenú stimuláciu rastu buniek v prostredí bioreaktora s využitím počítačového videnia.