



MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí



Studium testikulární toxicity pomocí in vitro modelů

Diplomová práce

Eliška Blažková

VEDOUCÍ PRÁCE: RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.

Brno 2018

Bibliografický záznam

Autor:	Eliška Blažková Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí
Název práce:	Studium testikulární toxicity pomocí in vitro modelů
Studijní program:	Experimentální biologie
Studijní obor:	Speciální biologie, směr Ekotoxikologie
Vedoucí práce:	RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.
Akademický rok:	2017/2018
Počet stran:	98 + 14
Klíčová slova:	<i>in vitro</i> modely, <i>in vivo</i> modely, kultivace buněk, Leydigovy buňky, methoxychlor, multicelulární sféroidy, reprodukční toxicita, testikulární toxicita, triklokarban, triklosan

Bibliographic Entry

Author: Eliška Blažková
Faculty of Science, Masaryk University
Research centre for toxic compounds in the environment

Title of Thesis: *In vitro* models in testicular toxicity assessment

Field of Study: Special Biology, orientation Ecotoxicology

Supervisor: RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.

Academic Year: 2017/2018

Number of Pages: 98 + 14

Keywords: *in vitro* models, *in vivo* models, cell culturing, Leydig cells, methoxychlor, multicellular spheroids, reproductive toxicity, testicular toxicity, triclocarban, triclosan

Abstrakt

V diplomové práci je nastíněna problematika narušení samčí reprodukce, která může být způsobená mnoha vnějšími vlivy včetně kontaktu člověka s chemickými látkami působícími nepříznivě na testikulární systém (varlata), což může vést až k neplodnosti. Teoretická část se zabývá využitím 3D *in vitro* modelů v hodnocení testikulární toxicity a v objasnění buněčných a molekulárních mechanismů vedoucích k narušení samčí reprodukce. Celá práce se zaměřuje zejména na jeden typ testikulárních buněk, na Leydigovy buňky, které hrají nezastupitelnou roli v produkci samčích pohlavních hormonů nezbytných pro správný vývoj varlat a produkci funkčních spermií. Shrnuje jejich vývoj a funkce ve zdravém organismu, dostupné zdroje těchto buněk pro *in vitro* modely spolu s jejich výhodami i nevýhodami, dále přináší informace o výhodách a nevýhodách dostupných 3D *in vitro* modelů a o jejich praktickém využití při hodnocení testikulární toxicity v toxikologii. Praktická část této práce je zaměřena na pokročilý 3D *in vitro* model multicelulárních sféroidů tvořený Leydigovými TM3 buňkami a na jeho využití při stanovení testikulární toxicity vybraných environmentálně relevantních kontaminantů životního prostředí (herbicide methoxychlor, produkty osobní potřeby triklosan a triklokarban), které jsou podezřelé z nepříznivého ovlivňování reprodukčního a endokrinního systému samců. Vliv látek byl hodnocen pomocí parametrů charakterizujících velikost, tvar a životaschopnost sféroidů. Triklosan neměl podstatný vliv na 3D model Leydigových buněk na rozdíl od 2D modelu. Naproti tomu methoxychlor sice nesnižoval životaschopnost buněk tvořících sféroid, ale způsoboval narušení jejich tvaru a kompaktnosti. Triklokarban vykazoval nejvyšší testikulární toxicitu a ovlivňoval nejen velikost a tvar sféroidů, ale i jejich životaschopnost.

Abstract

The diploma thesis addresses the problem of the male reproduction which can be caused by many external factors including chemicals having adverse effects on testicular system (testis) which may lead to infertility. The theoretical part of this thesis deals with the use of the 3D *in vitro* models in the assessment of testicular toxicity and in the assessment of cellular and molecular mechanisms leading to impairment of male reproduction. The thesis is focused mainly on one type of testicular cells, on Leydig cells which play an important role in the production of male sex hormones essential for the development of testis and for the production of mature sperms.

The thesis summarizes the development and functions of Leydig cells, the sources of this testicular cell type for *in vitro* models including their advantages and disadvantages and brings information on advantages and disadvantages of 3D *in vitro* models and on their usefulness for testicular toxicity assessment in toxicology. The practical part of the thesis is focused on an advanced 3D *in vitro* model of multicellular spheroids formed by Leydig TM3 cells and its application for the evaluation of testicular toxicity of environmentally relevant contaminants (herbicide methoxychlor, personal care products triclosan and triclocarban). The chemical impact was evaluated using parameters characterizing size and shape and viability of spheroids. Triclosan had no significant impact on 3D model of Leydig cells, which is in contrast to 2D model. Methoxychlor did not decrease viability of cells forming spheroids but disturbed their shape and compactness. Triclocarban was the most potent testicular toxicant and affected not only the size and shape of spheroids, but also their viability.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno studenta/ky:	Eliška Blažková	UČO: 423765
Studijní program/Obor:	Experimentální biologie / Speciální biologie	
Název práce:	Studium testikulární toxicity pomocí <i>in vitro</i> modelů	
Název práce anglicky:	<i>In vitro</i> models in testicular toxicity assessment	
Vedoucí:	RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.	
Konzultant(i):	Mgr. Petra Labohá, Ph.D.	
Datum zadání:	25. října 2016	
Datum odevzdání:	květen 2018 (bude upřesněno)	

Postup a zásady pro vypracování:

Práce bude zaměřena na reprodukční toxicitu, přesněji na testikulární toxicitu a její hodnocení *in vitro* pomocí pokročilých metod relevantnějších pro *in vivo* situaci (tvorba 3D struktur či kokultivace). Vybrané modelové látky se známou reprodukční toxicitou u samců a významné environmentální kontaminanty budou studovány, zda nemohou působit jako testikulární toxikanty.

Cílem práce bude:

- 1) sepsat rešerši o problematice testikulární toxicity environmentálně významných látek, její významnosti a aktuálnosti;
- 2) hodnocení testikulární toxicity významných environmentálních látek pomocí pokročilých *in vitro* modelů.

1) Zvládnutí práce s pokročilými *in vitro* modely pro hodnocení testikulární toxicity

Studentka se naučí základům sterilní práce s buněčnými kulturami testikulárních buněk, pracovat s pokročilými *in vitro* modely (tvorba sféroidů, ko-kultivace).

Termín: konec roku 2016

2) Realizace experimentální části práce

Studentka bude optimalizovat expozici obou modelů a následné hodnocení různých parametrů (např. růst, životaschopnost, produkce laktátu, produkce testosteronu) ukazujících na možnou testikulární toxicitu pomocí modelových látek. Následně využije oba modely pro hodnocení testikulární toxicity vybraných kontaminantů životního prostředí.

Termíny: experimentální činnost – po celou dobu do 30.4.2018, zpracování a interpretace výsledků do diplomové práce – 15.5.2018

3) Literární rešerše - aktualizace, rozšíření a prohloubení detailnosti literární rešerše

Cílem je aktualizovat literární rešerši o problematice testikulární toxicity environmentálních kontaminantů. Studentka zpracuje nové poznatky z literatury do přehledné, srozumitelné a zároveň přesné literární rešerše obsahující zejména následující body:



- Stručný úvod do problematiky testikulární toxicity environmentálních kontaminantů a její aktuálnosti
- Shrnutí testikulárních účinků významných kontaminantů životního prostředí a reálných následků jejich expozice
- Daní do souvislostí reálných testikulárních účinků známých environmentálních kontaminantů s hodnocením jejich testikulární toxicity v dostupných *in vitro* modelech

Doporučená literatura:

Disertační, diplomové a bakalářské práce zpracované na podobné téma dříve v Centru: – lze najít a stáhnout z IS.MUNI.CZ

Odborné vědecké články z Web of Science, Scopus, Science Direct, Scholar Google apod.

V Brně dne: 26.10.2016

Podpis vedoucí práce:

Podpis student/ka:

Podpis pedagogický zástupce ředitele Centra:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce RNDr. Ivě Sovadinové, Ph.D. za výborné vedení a cenné rady, laskavý přístup a andělskou trpělivost. Taktéž chci poděkovat celému přátelskému kolektivu buněčných laboratoří výzkumného centra RECETOX, zejména Mgr. Elišce Sychrové, Ph.D. za velikou pomoc s praktickou částí.

Prohlášení

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

Brno 18. května 2018

.....

Eliška Blažková

Teoretická část

Obsah

Teoretická část	9
Úvod	14
1 Testikulární toxicita	15
1.1 Hodnocení testikulární toxicity	15
2. Pokročilé modely testikulárních buněk	19
2.1 Testikulární systém & cíle testikulárních toxikantů.....	19
2.2. Leydigovy buňky jako cíl testikulárních toxikantů	21
2.2.1 Typy Leydigových buněk & jejich funkce.....	22
2.2.2 Zdroje Leydigových buněk	26
2.3 3D modely testikulárních buněk.....	29
3. Využití pokročilých modelů testikulárních buněk v toxikologii	33
Experimentální část	36
4. Materiál a metody	36
4.1 Použitá linie buněk	36
4.2 Kultivace a pasážování Leydigových TM3 buněk.....	37
4.2.1 Materiál	37
4.2.2 Pasážování a kultivace buněk.....	37
4.3 Vytváření mnohobuněčných sféroidů metodou 3D Petri Dish®	38
4.3.1 Materiál	38
4.3.2 Postup.....	39
4.3.3 Hodnocení parametrů charakterizujících vlastnosti sféroidů	40
4.4 Hodnocení životaschopnosti Leydigových TM3 buněk tvořících sféroid pomocí resazurinu	42
4.4.1 Materiál	42
4.4.2 Postup.....	43

4.5 Testované látky a podmínky expozice.....	43
4.6. Statistické vyhodnocení dat	45
5 Výsledky.....	46
5.1 Optimalizace podmínek pro tvorbu mnohobuněčných sféroidů a hodnocení jejich životaschopnosti.....	46
5.1.1 Ekvilibrace mikrogelů před nasazením buněk	46
5.1.2 Změna velikosti a tvaru sféroidů z Leydigových TM3 buněk v závislosti na počáteční koncentraci nasazených buněk a na čase.....	48
5.1.3 Vliv složení kultivačního média na charakteristiky sféroidů během kultivace	53
5.1.4 Optimalizace hodnocení vlivu látek na životaschopnosti sféroidů	59
5.2 Hodnocení testikulární toxicity vybraných látek v 3D modelu Leydigových buněk	61
5.2.1 Hodnocení testikulární toxicity TPA	61
6.1.2 Hodnocení testikulární toxicity MTX	66
5.1.3 Hodnocení testikulární toxicity TCS.....	71
5.1.3 Hodnocení testikulární toxicity TCC	76
6 Diskuze.....	81
6.1. 3D model Leydigových buněk.....	81
6.2 Hodnocení testikulární toxicity	83
Závěr	89
7. Seznam literatury	90
8. Přílohy.....	99
Příloha 1.....	99
Příloha 2.....	101
Příloha 3.....	105
Příloha 4.....	107
Příloha 5.....	109
Příloha 6.....	111

Seznam zkratk

2D – dvourozměrné prostředí

3D – trojrozměrné prostředí

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

3 α -diol – 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol

3 β -HSD – 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza

5 α -DTH – 5 α -dihydrotestosteron

ACR – protein pro regulaci aktivity cytoskeletu

ADI – akceptovaný denní příjem („acceptable daily intake“)

ALCs – dospělé Leydigovy buňky („adult Leydig cells“)

AR – androgenní receptor

ASCs – dospělé kmenové buňky („adult stem cells“)

BPA – bisfenol A

BTB – hematotestikulární bariéra („blood-testis barrier“)

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

c-KIT – gen pro tirozinkinázový receptor

DAZL – „deleted in azoospermia-like“

DEHP – di-2-ethylhexyl ftalát

DBCP – 1,2-dibromo-3-chloropropan

DHH – Desert hedgehog protein

DHT – dihydrotestosteron

DMEM – Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium („Dulbecco's Modified Eagle's Medium“)

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina („deoxyribonucleotide acid“)

DNPTE – vývojově netoxické ftaláty

DTPE – vývojově toxické ftaláty

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

ED – endokrinní disruptor

EDSP – skriningový program endokrinních disruptorů („Endocrine Disruptor Screening Program“)

EDSTAC – Poradní výbor pro skriningování a testování endokrinních disruptorů („Endocrine Disruptor
Screening and Testing Advisory Committee“)

EGME – ethylglykol monoethyleter

ER – estrogenní receptor

ESC – embryonální kmenové buňky („embryonic stem cells“)

FBS – fetální bovinní sérum

FLCs – fetální Leydigovy buňky („fetal Leydig cells“)

FSH – folikulo-stimulační hormon

GJIC – mezibuněčná komunikace mezerovými spoji („gap junction intercellular communication“)

GnRH – hormon uvolňující gonadotropin („gonadotropin-releasing hormone“)

GPF – zelený fluorescenční protein

hCG – choriový gonadotropin („human chorionic gonadotropin“)

HTS – vysoce propustný skrínig („high throughput screening“)

HPT – osa hypothalamus-hypofýza-varlata („hypthalamus-pituitary-testicular axis“)

HPTE – 2,2-bis(*p*-hydroxyfenyl)-1,1,1-trichloroethan

HS – koňské sérum

ICCVAM – Mezirezortní koordinační výbor pro validaci alternativních metod („Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods“)

ICH – Mezinárodní rada pro harmonizaci („International Conference on Harmonisation“)

ICM – embryoblast („inner cell mass“)

ILCs – nezralé Leydigovy buňky („immature Leydig cells“)

INSL3 – hormon podobný inzulinu

iPSCs – indukované pluripotentní buňky („induced pluripotent stem cells“)

LH – luteinizační hormon

LHCGR – receptor pro luteinizační hormon a choriový gonadotropin

LHR – receptor pro luteinizační hormon

LIF – inhibiční faktor leukémie

LIFR – receptor pro inhibiční faktor leukémie

MCF-7 – imortalizované buněčné linie lidského andenokarcinomu prsu

MTX – methoxychlor

OECD – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj („The Organisation for Economic Co-operation and Development“)

P450_{scc} – cytochrom P450 se štěpícím postranním řetězcem

PBS – pufovaný fyziologický roztok („physiological buffer saline“)

PCPs – produkty osobní potřeby („personal care products“)

PDGF α – růstový faktor A derivovaný z trombocytů

PDGFR α – receptor pro růstový faktor derivovaný z trombocytů

PLCs – progenitorové Leydigovy buňky („progenitor Leydig cells“)

PRM1 – protamin 1

QSAR – aktivita látky ve vztahu k její struktuře („quantitative structure-activity relationship“)

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

RA – kyselina retinová

SC – kmenové buňky („stem cells“)

SEM – směrodatná odchylka průměru

SLCs – kmenové Leydigovy buňky („stem Leydig cells“)

SPC – spermatocyty

SSCs – spermatogoniální kmenové buňky („spermatogonial stem cells“)

TCC – triklokarban

TCS – triklosan

TDF – faktor determinující varlata („testis-determining factor“)

TDG – testikulární dysgeneze („testicular dysgenesis“)

TG – technický manuál („test guideline“)

TPA – tetradekanoyl forbol acetát

US EPA – americká Agentura pro životní prostředí („US Environmental Protection Agency“)

US NCR – Národní rada pro výzkum v USA

WT1 – Wilmův tumor protein 1

Úvod

S problémem s reprodukcí se potýká mnoha mužů po celé světě. Neplodnost může způsobovat mnoho faktorů od životního stylu přes používání léčiv až po působení chemických látek negativně ovlivňujících stavbu i funkci samčího testikulárního systému. Diplomová práce je zaměřená na hodnocení testikulární toxicity pomocí *in vitro* modelů. *In vitro* přístup využívá buněčné kultury nebo tkáň pocházející z živých organismů, nejčastěji z hlodavců. Umožňuje studium a lepší porozumění interakcím a procesům odehrávajícím se ve varlatech a také slouží k hodnocení možného působení látek na testikulární systém. Postihuje však jen malou část celého komplexního systému, proto nemůže samotně zcela nahradit testování *in vivo*. Nadějí jsou v současné době pokročilé *in vitro* modely tvořící trojrozměrnou strukturu (3D) a připomínající mnohem věrněji skutečnou situaci *in vivo* než tradiční modely tvořící dvourozměrnou strukturu (2D). Pozornost práce je zaměřena zejména na Leydigovy buňky, jež tvoří důležitou složku testikulárního systému a jejichž správná funkce, tedy produkce samčích pohlavních hormonů, je nezbytná pro produkci pohlavních buněk v dostatečné kvalitě i kvantitě. Cílem teoretické části je přinést nejnovější poznatky z oblasti využití pokročilých 3D modelů v hodnocení testikulární toxicity a jejich kritické zhodnocení včetně jejich výhod a nevýhod.

Cílem praktické práce byla optimalizace a praktické využití pokročilého 3D modelu multicelulárních sféroidů tvořených Leydigovými TM3 buňkami k hodnocení testikulární toxicity chemických látek. Vybranými látkami jsou environmentálně relevantní kontaminanty životního prostředí – herbicid methoxychlor a produkty osobní potřeby triklosan a triklokarban. Všechny tři látky jsou podezřelé, že negativně působí na samčí testikulární orgán, tedy na varlata, nebo na endokrinní systém. Vyskytují se v životním prostředí a člověk s nimi tím pádem může přijít do kontaktu. Účinky studovaných látek na 3D model Leydigových buněk byly hodnoceny porovnáním velikosti, tvaru a životaschopnosti exponovaných a neexponovaných sféroidů. Cílem práce bylo také posoudit, zda model mnohobuněčných sféroidů Leydigových buněk představuje vhodný způsob pro posouzení testikulární toxicity látek.

1 Testikulární toxicita

Hlavním cílem reprodukčního procesu u dospělých samců je produkce pohlavních buněk (spermii) schopných oplození a následná produkce životaschopných potomků (Saldutti et al., 2013). V posledních desetiletích byl celosvětově v mužské populaci zaznamenán zvýšený výskyt vývojových defektů a nádorů samčích reprodukčních orgánů, také kvantita a kvalita spermií se snížila, což se projevilo i v nárůstu problému s plodností. Např. v Evropě se problém neplodnosti týká asi 15 % párů (Pěkníková, 2007), z toho 40 % je způsobeno pouze mužským a 40 % pouze ženským faktorem, zbývajících 20 % představuje kombinaci faktoru mužského i ženského (Doherty and Clark, 2006).

Samčí vnitřní pohlavní orgán, tedy párová varlata, je citlivý k negativním zásahům vnějšího i vnitřního prostředí. Stres, špatná životospráva, kouření, požívání drog, léčba chemoterapeutiky či antibiotiky mohou být testikulárně toxické, tedy negativně působit na testikulární systém (varlata), a tím nepříznivě ovlivňovat samčí reprodukci. Také kvalita životního prostředí hraje důležitou roli (Pěkníková, J. 2007). Varlata jsou častým cílem působení chemických látek. Některé kontaminanty životního prostředí, jako jsou např. pesticidy, potravinová aditiva, průmyslově používaná rozpouštědla a změkčovače plastů, těžké kovy (Cd, Pb; Reis et al. 2015) jsou testikulárními toxikanty a tímto způsobem zasahují do procesu samčí reprodukce (Saldutti et al., 2013). Proto by bylo užitečné detekovat testikulární toxicitu při vývoji nových léčiv nebo při hodnocení nebezpečnosti nových či již používaných chemických látek tak brzo, jak je možné.

1.1 Hodnocení testikulární toxicity

Pro hodnocení reprodukční toxicity včetně testikulární toxicity chemických látek se v dnešní době nejčastěji využívá tradiční přístup testování, tedy metody *in vivo*, požadující k testování látek živé organismy, především vyšší obratlovce (Kubincová a kol., 2016). Použití zejména hlodavců dovoluje rozsáhle studovat účinky látek na celý živý organismus (Daston et al., 2007), v případě testikulární toxicity se zejména hodnotí kvalita i kvantita pohlavních buněk (Chapin et al., 2013), ale také váha pohlavních orgánů a provádí se i jejich histopatologické vyšetření (OECD TG 422, 2014). Takovéto testování je nákladné, zdlouhavé, spotřebovává i velké množství zvířat a potýká se s etickými problémy (Saldutti et al., 2013). Kromě toho neumožňuje podrobné studium mechanismů působení látek (Kubincová a kol., 2016). Značné omezení představují i mezidruhové rozdíly mezi lidmi a hlodavci, kteří se nejčastěji pro testování *in vivo* používají. Bylo zjištěno, že extrapolace výsledků ze zvířat na člověka je přesná z 50–70 %, výsledky testování navíc závisí na laboratoři, kde se testování provádí, a na hodnocených orgánech. Některé látky jsou tedy vyhodnoceny jako toxické, ačkoli jsou pro člověka neškodné, a naopak (Chapin et al., 2013). Tyto problémy provázejí i testování léčiv, přičemž bylo

zjištěno, že ročně dochází k vývoji průměrně třech nových léčiv, které jako vedlejší účinek způsobují testikulární toxicitu (Sasaki et al., 2011).

V roce 2007 nabylo účinnosti nařízení systém REACH (registrace, hodnocení, povolování chemikálií), který nařizuje získat informace o nebezpečných vlastnostech pro všechny chemické látky vyráběné v EU nebo do ní dovážené v množství větším než 1 t za rok. Cílem tohoto kroku je do roku 2020 dovážet a prodávat pouze registrované chemické látky za účelem ochrany lidského zdraví a používání látek způsobem neohrožujícím životní prostředí (www.chemportal.cz). Množství chemikálií nutných otestovat je odhadováno asi na 30 tisíc a je nemožné všechny tyto látky hodnotit pomocí *in vivo* testování (Kubincová a kol., 2016). Národní rada pro výzkum v USA (US NCR) provedla analýzu metod, které se tradičně používají k hodnocení toxicity a nastínila další postupy a vize v této oblasti (US National Research Council, 2007). Jelikož se ukázalo, že využívané postupy spočívající především v testování *in vivo* s použitím zvířat nejsou příliš relevantní při přenesení získaných výsledků na člověka, navrhuje US NCR využít nové poznatky molekulární biologie, biotechnologií, počítačového modelování toxicity a hodnocení zdravotních rizik potenciálně toxických látek. Nový přístup k posuzování toxicity látek by měl využívat biologické modely, které jsou relevantní, tvořené nerakovinnými buňkami pocházejícími od člověka, nikoli od zvířete, a pěstované pokročilým způsobem v prostředí přibližujícím se skutečným podmínkám v organismu. Takové modely by umožnily lépe porozumět mechanismům buněčných procesů a signálních drah ovlivněných chemickými látkami. Zde by se daly využít také progresivní technologie označované názvem s příponou „omika“ (transkriptomika, proteomika, genomika, metabolomika, cytomika). Důležitá je také automatizace a robotizace procesů, k tomu by se dal využít vysokokapacitní HTS (high-throughput screening) a vysokoobsahové systémy HCS (high-content screening). Důležitá je tedy podpora vývoje a používání pokročilých *in vitro* a *in silico* metod a snaha o jejich zařazení do legislativy USA (Kubincová a kol., 2016).

Podporu alternativních přístupů, tedy i *in vitro* modelů, přináší koncept 3R (Replacement – nahrazení, Reduction – snížení a Refinement – zjemnění), který se snaží nahradit testování *in vivo* alternativním přístupem nebo alespoň snížit počet zvířat použitých k testování látek a dále co nejvíce snížit jejich utrpení nebo vylepšit podmínky jejich použití (Saldutti et al., 2013; Kubincová a kol., 2016). Proto v současné době dochází k rozvoji alternativních metod bez použití zvířat, nebo alespoň s minimálním testováním na zvířatech. Alternativní je tedy každá metoda splňující alespoň jedno ze tří R (Kubincová a kol., 2016). Aby byly tyto alternativní metody či testy začleněny do legislativy a mohly se používat, musí nejprve projít složitým procesem vývoje, validace a implementace, což může trvat desítky let. Validací řízení probíhá pod dohledem Evropského centra pro validaci alternativních metod (ECVAM), Koordináčního výboru pro validaci alternativních metod USA (ICCVAM) a Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD; Kubincová a kol., 2016). V Tabulce 1 je přehled konkrétních

alternativních testů k hodnocení testikulární toxicity a endokrinní disrupce (narušení normálního fungování endokrinního systému), ať již validovaných, či teprve v procesu validace.

Tabulka 1: Alternativní testy pro reprodukční toxicitu a endokrinní disrupci (Blažková, 2015).

Název	Test	Validační status	Regulační status	Koncept 3R	Účel testu
Rozšířená jednogenetická studie reprodukční toxicity	<i>in vivo</i>	Žádné dostupné informace	OECD: TG 443	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 414, 415, 416 a 426 - Používá méně zvířat - Více dat o každém zvířeti
Kombinace metody dávkování se skriningovým testem pro reprodukční toxicitu	<i>in vivo</i>	Žádné dostupné informace	OECD: TG 422 (1996)	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 407 a 412 - Zahrnuje uterotrofský a Hershbergerův test
Test embryotoxicity využívající embryonální kmenové buňky (EST)	<i>in vitro</i>	EU: ECVAM schválil jako validní pro identifikaci látek slabě nebo silně embryotoxických nebo nezpůsobujících embryotoxicitu (2002)	Žádná informace	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 407 a 412 - Zahrnuje uterotrofský a Hershbergerův test
Test embryotoxicity využívající <i>in vitro</i> kulturu ze zabíjených embryí (MM)	<i>in vitro</i>	EU: ECVAM schválil jako validní pro identifikaci silně embryotoxických látek (2002)	Žádná informace	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 414 - Součást testovací strategie pro testování reprodukční toxicity
Test embryotoxicity využívající celá embrya zabíjených zvířat (WET)	<i>in vivo</i>	EU: ECVAM schválil jako validní pro identifikaci látek slabě embryotoxických nebo nezpůsobujících embryotoxicitu (2000)	Žádná informace	Zlepšení podmínek (používá embrya zabíjených zvířat)	- Alternativa k OECD TG 414 - Součást testovací strategie pro testování reprodukční toxicity
Test stanovující vazbu na AR receptor (cytosolová frakce přední části prostaty potkana)	<i>ex vivo</i>	US: prevalidace ICCVAM (2002), validace EPA (2007)	US: Úroveň 1 v EDSP (EDSTAC)	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 416 - Součást schémat stupňovitěho testování pro ED
Test využívající vazbu na ER receptor (cytosolová frakce dělohy potkana)	<i>ex vivo</i>	US: prevalidace ICCVAM (2002), validace EPA (2007)	US: Úroveň 1 v EDSP (EDSTAC)	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 416 - Používá méně zvířat - Součást schémat stupňovitěho testování pro ED
Test stanovující aktivitu mikrosomální aromatázy	<i>in vitro</i>	US: validováno US EPA (2007) ke stanovení látek inhibujících aromatázu	US: Úroveň 1 v EDSP (EDSTAC)	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 416 - Součást schémat stupňovitěho testování pro ED

Pokračování tabulky 1: Alternativní testy pro reprodukční toxicitu a endokrinní disrupci (Blažková, 2015).

Test stanovující vazbu na lidský rekombinantní ER α	<i>in vitro</i>	OECD: probíhá validace US: prevalidace ICCVAM (2002)	OECD: návrhy dvou protokolů (GD) US: Úroveň 1 v EDSP (EDSTAC)	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 416 - Součást schémat stupňovitého testování pro ED
Test stanovující agonisty lidského ER pomocí buněčné linie hER-HeLa-9903	<i>in vitro</i>	OECD: validace US: validace (ICCVAM)	OECD: TG 455 (2013)	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 416 - Součást schémat stupňovitého testování pro ED
Test stanovující agonisty a antagonisty lidského ER pomocí buněčné linie BG1Luc	<i>in vitro</i>	OECD: validace US: validace (ICCVAM)	OECD: TG 457 (2012) US: Úroveň 1 v EDSP	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 416 a 426 - Součást stupňovitého testování pro ED
Test steroidogeneze založený na buňkách H295R	<i>in vitro</i>	OECD: probíhá validace (US EPA)	OECD: TG 456 (2011) US: Úroveň 1 v EDSP (EDSTAC)	↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 416 - Součást schémat stupňovitého testování pro ED
Proliferace buněk po působení látek s estrogení aktivitou (CertiChem Inc. MCF-7)	<i>in vitro</i>	US: mezilaboratorní validační studie laboratoře CertiChem-Inc; test s vysokou prioritou pro další validaci dle ICCVAM	Žádné dostupné informace	Nahrazení ↓ počtu	- Alternativa k OECD TG 416 - Součást schémat stupňovitého testování pro ED

AR – androgenní receptor, ECVAM – Evropské centrum pro validaci alternativních metod, ED – endokrinní disrupce, EDSP – skrínigový program endokrinních disruptorů, EDSTAC – Poradní výbor pro skrínig endokrinních disruptorů, ER – estrogení receptor, ICCVAM – Mezirezortní koordinační výbor pro validaci alternativních metod, MCF-7 – imortalizované buněčné linie lidského adenokarcinomu prsu, OECD – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, TG – technický manuál, US EPA – americká Agentura pro životní prostředí.

Sledování účinků látek na samčí reprodukční soustavu je velmi náročné, jelikož se jedná o velmi komplexní systém. V současnosti dochází k vývoji či zdokonalení *in silico*, *in vitro* či *ex vivo* modelů (www.alttox.org). Ke snížení *in vivo* testování a zlepšení predikce toxicity by mohla vést vhodná kombinace alternativních testů (*in silico*, *in vitro*, *ex vivo*), nazývaná baterie testů a tzv. stupňovité schéma testování (tiered test strategy), kdy jsou výsledky z jednoho stupně testování použity pro následný komplexnější krok (Kubincová a kol., 2016; Saldutti et al., 2013). Nejprve jsou tedy hodnoceny informace získané v prvním kroku testování (řešerše literatury a zisk dostupných informací o testované látce) a pokud nedostačují k predikci účinků látky, přistupuje se k další úrovni testování. Druhou úroveň představuje modelování biologické aktivity posuzované látky na základě její struktury (QSAR), ve třetí úrovni se přistupuje k *in vitro* testům, 3D buněčným modelům a testům na nižších živočiších. Poslední úroveň představuje *in vivo* testování na savcích (Kubincová a kol., 2016). Na konci procesu jsou

posouzeny všechny získané informace a je vyřčeno rozhodnutí o testované látce. Tento přístup byl zkoumán i pro reprodukční či testikulární toxicitu např. v rámci projektu ReProTect (Hareng et al., 2005; Saldutti et al., 2013). Důležitou součástí stupňovitého testování jsou tedy i modely *in vitro* nebo *ex vivo* (izolované orgány nebo tkáně), které by v kombinaci s metodami *in situ* (počítačové simulace) mohly vést až k nahrazení *in vivo* testování v rámci validovaného stupňovitého schématu testování. *In vitro* testy používají buňky a živé tkáně, pro testikulární systém je účelem dosažení co nejpřesnějšího popisu vlivu zkoumaných látek na klíčové aspekty procesů spermatogeneze a hormonálního působení. Konvenční *in vitro* modely využívají kultivaci testikulárních buněk ve dvourozměrném (2D) provedení, což ovšem má své limity. V současnosti se pozornost věnuje tkáňovým nebo buněčným modelům s trojrozměrnou strukturou (3D), které mnohem věrněji napodobují *in vivo* prostředí než ve 2D, ovšem i tyto modely stále mají mnohá omezení (Saldutti et al., 2013).

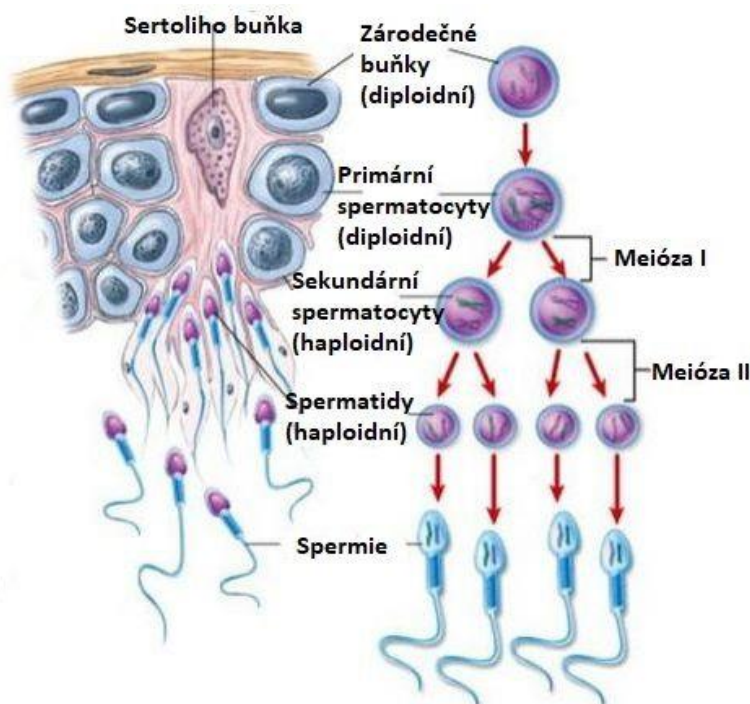
2. Pokročilé modely testikulárních buněk

2.1 Testikulární systém & cíle testikulárních toxikantů

In vitro modely vhodné k testování testikulární toxicity kopírují důležité jevy a procesy testikulárního systému *in vivo*. Plně funkční samčí pohlavní buňky (spermie) vznikají velmi složitým procesem spermatogeneze, která je závislá na přesném fungování steroidogeneze (tvorba androgenů, samčích pohlavních hormonů) a androgenní signalizace. Narušení procesu spermatogeneze vedoucí např. k poklesu počtu spermií a ke zvýšení množství spermií s morfologickými abnormalitami či poškozenou DNA (deoxyribonukleová kyselina) může mít nepříznivý dopad na samčí reprodukci (Reis et al., 2015). Důležité buňky pro proces steroidogeneze představují somatické Leydigovy buňky produkující samčí pohlavní hormony (též intersticiální buňky), které spouští diferenciaci, vývoj a zrání samčích pohlavních orgánů. Leydigovy buňky osídlují vazivové výplně mezi semenotvornými kanálky. Somatické Sertoliho buňky tvoří podporu pro semenotvorné kanálky a vytvářejí vhodné prostředí pro spermatogenezi tím, že vylučují hormony, vyživující a podporující faktory, čím řídí proces spermatogeneze, vyživují a chrání nepoškozené zárodečné buňky a naopak fagocytují poškozené zárodečné buňky (Langmeier a kol., 2009). Svými mezerovými spoji tvoří hematotestikulární bariéru (BTB) sloužící k oddělení kanálku od okolního prostředí (Stárka, 2010). Denní produkce spermií (zralých zárodečných buněk) je závislá právě na konečném počtu Sertoliho buněk, protože jednotlivá Sertoliho buňka může umožnit dozrát pouze omezenému počtu zárodečných buněk (Plant, 2015).

Semenotvorné kanálky jsou tvořeny vrstvou zárodečných buněk v různých stádiích vývoje, penetrují přes Sertoliho buňky (Reis et al., 2015). Ze zárodečné buňky, tedy spermatogonia, vznikají mitotickým dělením nejprve diploidní primární spermatocyty, následně probíhá meiotické dělení a

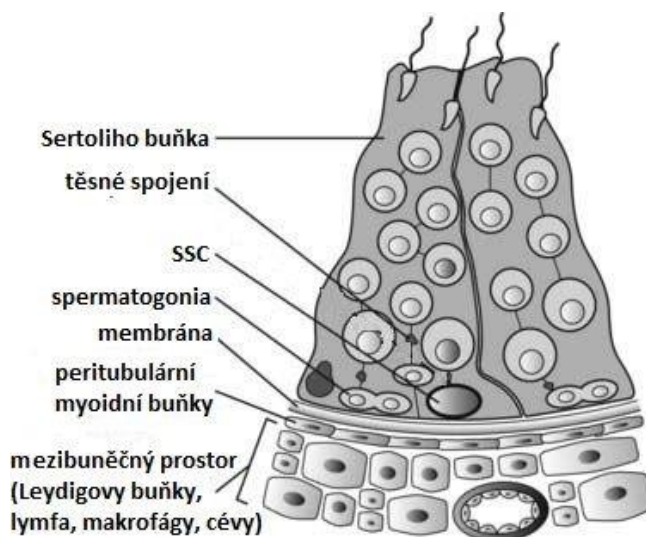
vznikají haploidní sekundární spermatocyty (Obrázek 1). Dochází k dalšímu meiotickému dělení, produktem jsou dále se již nedělící haploidní spermatidy. Po projití morfologickými změnami (kondenzace jádra, tvorba bičíku, ztráta některých organel a většiny cytoplasmy) ze spermatid vznikají nezralé spermie. Diferenciací se z nich stávají zralé spermie, které následně putují do lumenu semenotvorných kanálků (Langmeier a kol., 2009). K výživě spermií a jejich transportu ze semenotvorných kanálků do nadvarlete slouží intersticiální tekutina (Saldutti et al., 2013).



Obrázek 1: Proces spermatogeneze v semenotvorném kanálku
(www.canvas.instructure.com/courses/1021937/pages/spermatogenesis [cit 13. 5. 2018]).

Testikulární systém představuje velmi složité propojení, souhru a spolupráci testikulárních buněk a působení hormonů. Proces spermatogeneze je plně závislý na působení pohlavních hormonů a na souhře a funkci osy hypotalamus, hypofýza a varlata (osa HPT). Obzvláště citlivá na působení toxických látek je raná fáze vývoje varlat, kdy poškození buněk produkujících androgeny či narušení působení hormonů může ohrozit správné fungování reprodukční soustavy (Saldutti et al., 2013; Langmeier a kol., 2009). Např. choriový gonadotropin (hCG) produkovaný placentou má vliv na syntézu testosteronu v raném fetálním období. Z hypotalamu se vylučuje hormon uvolňující gonadotropin (GhRH), který stimuluje adenohypofýzu k sekreci luteinizačního hormonu (LH), spouštějícího sekreci androgenů z Leydigových buněk, a folikulostimulačního hormonu (FSH), který působí přes Sertoliho buňky na proces spermatogeneze (Saldutti et al., 2013). Cílů toxického působení testikulárních toxikantů tedy může být mnoho, od přímého působení na testikulární buňky přes ovlivnění procesů spermatogeneze a steroidogeneze přímo ve varlatech až po nepřímé působení přes osu HPT

(Svechnikov et al., 2010). Mnohou být přímo poškozeny důležité typy testikulárních buněk, jakou jsou zárodečné buňky, Sertoliho buňky nebo peritubulární buňky (Obrázek 2). Míra poškození se liší dle typu buněk a dle jejího vývojového stádia, např. látka může mít závažnější účinky na populaci kmenových buněk, než když se jedná o již zralé buňky (Zhang et al., 2008). Míra poškození se také liší dle typu dle vývojového stádia plodu či organismu. Embryotoxické látky jsou známé svým vysoce negativním působením na vývoj plodu a mohou narušit i správný vývoj varlat a následně mít dopad na reprodukci. Mohou způsobovat např. nesestoupení varlat do šourku (kryptorchismus) nebo vrozený rozštěp močové trubice (hypospadiie), které patří k častým příčinám neplodnosti nebo snížené plodnosti mužů v reprodukčním věku (Chapin et al., 2013). Působení testikulárně toxických látek na BTB může způsobit předčasné uvolňování spermatid do lumenu semenotvorného kanálku, dále ovlivnit proces vyprazdňování a resorpce intersticiální tekutiny, což způsobuje narušení transportu spermií a celý proces spermatogeneze (Saldutti et al., 2013). Některé látky působící jako endokrinní disruptory mohou ovlivňovat tvorbu, sekreci, navázání nebo metabolismus a vylučování hormonů důležitých pro zrání pohlavních orgánů i buněk. Nejvíce prozkoumaným jevem je v souvislosti s testikulární toxicitou navázání se chemické látky na androgenní receptor (AR), který je pak buď inhibován, nebo aktivován (Saldutti et al., 2013).



Obrázek 2: Různé typy testikulárních buněk a jejich umístění ve varlatech (www.oncohemakey.com/functional-morphology-of-the-testis, [cit 13. 5. 2018]). SSC – spermatogoniální kmenová buňka (spermatogonial stem cell).

2.2. Leydigovy buňky jako cíl testikulárních toxikantů

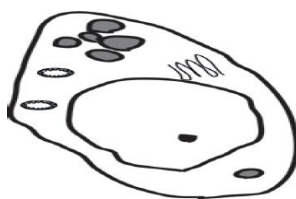
Již byla zmíněna důležitost různých typů testikulárních buněk (Obrázek 2) a jejich význam pro správné fungování testikulárního systému. Praktická část této práce je zaměřená především na Leydigovy buňky, proto jim bude věnována větší pozornost i v části teoretické. Leydigovy buňky pocházející ze zvířete byly poprvé popsány v roce 1850 Franzem Leydigem, lidské Leydigovy buňky byly

poprvé zkoumány o čtyři roky později Albertem Köllikerem (Landrech, 2014). Jedná se o typ vymezených epiteliálních buněk uložených ve vazivových výplních mezi semenotvornými kanálky varlat. Jejich tvar se mění v průběhu vývoje od vřetenovitého po kulatý nebo mnohostěnný spolu s jejich počtem a přítomností a tvarem buněčných organel (Svechnikov et al., 2010). Ve varlatech dospělého muže se nachází asi 200×10^6 Leydigových buněk, ve varlatech dospělé myši 50×10^6 . Leydigovy buňky představují hlavní zdroj androgenních hormonů, jejichž profil i množství se v průběhu života také mění. Hlavní androgen zralých dospělých Leydigových buněk, testosteron, hraje důležitou roli ve vývoji pohlavních orgánů a sekundárních pohlavních znaků a reguluje proces spermatogeneze. Hlavními markery těchto dospělých Leydigových buněk jsou receptor pro luteinizační hormon (LHR), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (3 β HSD) a hormon podobný inzulinu (INSL3; Landrech, 2014).

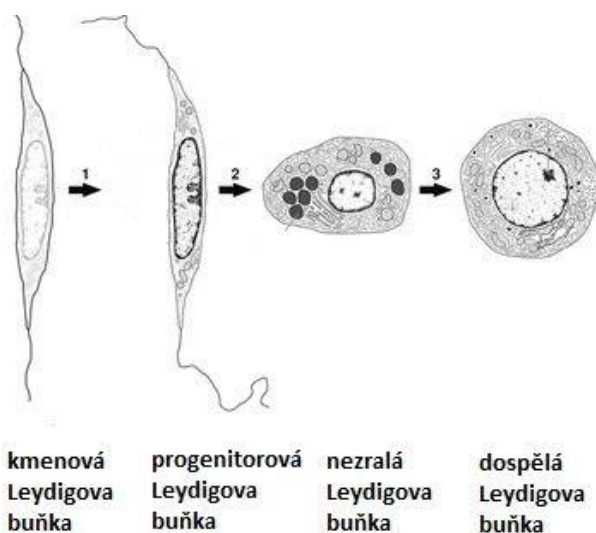
2.2.1 Typy Leydigových buněk & jejich funkce

Ve varlatech se nacházejí dvě populace (linie) Leydigových buněk lišící se od sebe morfologicky i funkčně. Už v prenatálním stádiu se objevují fetální Leydigovy buňky (FLCs), které tvoří odlišnou linii buněk od kmenových Leydigových buněk (SLCs), ze kterých se potom stávají progenitorové Leydigovy buňky (PLCs), z nich nezralé Leydigovy buňky (ILCs), které nakonec dozrávají v dospělé Leydigovy buňky (ALCs; Shima and Morohashi, 2017; Chen et al., 2010; Obrázek 3). Funkci FLCs přebírají po narození (u hlodavců během 2.–3. týdne) právě ALCs. Předpokládalo se, že FLCs poté pomalu degenerují, ovšem nedávné studie odhalily jejich přítomnost ve varlatech dospělých myší, přičemž FLCs tvořily zhruba 20 % celé populace Leydigových buněk. Zdá se, že FLCs jsou v dospělosti neaktivní a neprodukují androgeny (Wen et al., 2016). Je ale možné, že diferencují do jiného typu Leydigových buněk. Obecně je podporována teorie, že fetální a dospělé Leydigovy buňky mají odlišný původ (Wen et al., 2016). Ovšem některé studie (Shima et al., 2017) podporují hypotézu i o společném původu fetálních a dospělých Leydigových buněk, které vyšly ze stejného progenitorového fondu („progenitor pool“). Stále je však nejasné, jak mohlo dojít k vývoji tak morfologicky i funkčně odlišných populací Leydigových buněk ze společného základu (Shima and Morohashi, 2017). Jelikož existují různé typy Leydigových buněk, které se liší nejen morfologicky, ale i funkčně, mohou být také různě citlivé na přítomnost chemických látek. Proto je důležité zkoumat účinky látek na různé typy a vývojová stadia Leydigových buněk (Saldutti et al., 2013).

A.



B.



Obrázek 3: (A.) Fetální Leydigova buňka, (B.) Vývoj dospělé linie Leydigových buněk od kmenové přes progenitorovou a nezralou až po dospělou Leydigovu buňku (Landreh, 2014; Zirkin et al., (2010).

FLCs vznikají již záhy po oplodnění na počátku embryonálního vývoje (asi 12. den u embrya potkanů, 14. den u myši a 7.–8. týden, u člověka) z progenitorových buněk (Svechnikov et al., 2010). Původ progenitorů je zatím nejasný, nejspíš vznikají z více zdrojů, do úvahy připadají mesenchymální buňky mesenchymální buňky močopohlavního primordia („adrenogonadal primordium“) nebo migrující buněčné populace z mezodermového/coelomového epitelu (mezenchym), mezonefrických kanálků nebo neurální lišty (Shima and Morohashi, 2017; Landreh, 2014). Migrace, diferenciace, proliferace, růst nebo funkce progenitorů FLCs a samotných FLCs bývají podporovány proteiny (např. Desert hedgehog protein – DHH), mitogeny (např. růstový faktor A derivovaný z trombocytů - PDGF α), transkripčními faktory (např. Wilmův tumor protein 1 – WT1) i mikroRNA (např. *miR-140-3p/5p*) vylučovanými fetálními Sertoliho buňkami (Wen et al., 2016). Progenitory FLCs i samotné FLCs podporují svou další diferenciaci a aktivitu během celého vývoje fetálních varlat. FLCs mají oválný tvar, větší množství hladkého endoplazmatického retikula, mitochondrie, tukové kapénky a velké jádro a jadérko (Obrázek 3 A.). FLCs diferencují do steroidogenních buněk, tedy probíhá v nich testikulární steroidogeneze asi 15. den u potkana a 6.–7. týden u člověka. Představují pro plod primární zdroj androgenů a v kooperaci s fetálními Sertoliho buňkami produkují testosteron. Maxima dosáhne

produkce testosteronu u potkana asi 19. den embryonálního vývoje a u člověka asi 14.–18. týden. Proto FLCs hrají nezbytnou úlohu v procesu maskulinizace celého těla plodu, což zahrnuje i vývoj genitálií (penis a šourek; Shima and Morohashi, 2017), diferenciaci Wolfova kanálu do nadvarlete, chámovodu, prostaty a semenných váčků, rozvoj mozku plodu (neuroendokrinní funkce, pohlavní dimorfismus; Wen et al. 2016). FLCs také produkují INSL3, který se spolu s androgeny podílí na sestoupení varlat a při narušení jejich produkce dochází k nesestoupení varlat (kryptorchidismus), což může vést k neplodnosti nebo snížení plodnosti v dospělosti. Narušení funkce FLCs způsobuje tedy poruchu reprodukce u dospělých samců, takže FLCs nejsou důležité pouze pro prenatální maskulinizaci, ale i pro následující postnatální pohlavní diferenciaci typickou pro samce (Shima and Morohashi, 2017). Pravděpodobně se také podílí na proliferaci Sertoliho buněk (Wen et al., 2016). Existuje několik teorií, co se stane s FLCs po narození. Možné je, že dojde k jejich degeneraci, dediferenciaci (k buňkám podobným fibroblastům), přetrvávají jako druhý typ spolu s ALCs nebo rediferencují a vzniká z nich dospělá linie Leydigových buněk (Landreh, 2014).

Výzkumy týkající se FLCs byly prováděny především na myších či potkanech, ale je velmi pravděpodobné, že podobný vývoj Leydigových buněk probíhá i u většiny ostatních savců, nevyjímaje člověka. Největší známý rozdíl mezi hlodavčími a lidskými FLCs je závislost na LH (Shima and Morohashi, 2017). U myší hraje LH sekretovaný předním lalokem hypofýzy nezbytnou roli v postnatální produkci androgenů v ALCs. Fetální varlata také odpovídají na stimulaci LH, jelikož LHR je exprimovaný u FLCs kolem 16. dne embryonálního vývoje u hlodavců. Avšak nepřítomnost LH nebo LHR u embryí hlodavců neovlivňuje fetální maskulinizaci, což naznačuje, že diferenciaci FLCs a tvorba androgenů v FLCs nezávisí u hlodavců na LH. Počáteční formování hlodavčích FLCs je tedy na LH nezávislé (Shima and Morohashi, 2017). U člověka dochází k expresi LHR (receptor pro luteinizační hormon a choriový gonadotropin – LHCG) u FLCs před 11. týdnem těhotenství, koncentrace hCG je asi desetkrát vyšší než LH. Kromě toho genetická mutace v LHCG způsobuje u lidí pseudohermafroditismus, zatímco u lidí s mutací v genu pro luteinizační hormon, podjednotku β (LHB) probíhá maskulinizace normálně. Tyto nálezy podporují hypotézu, že lidské FLCs jsou závislé na placentární hCG, ale ne na LH. Tedy LH je u člověka důležitý kvůli produkci testosteronu a dalších androgenů v ALCs, do té doby je produkce testosteronu závislá na hCG. Další odlišnost mezi hlodavčími a lidskými u FLCs je konverze testosteronu na 5α -dihydrotestosteron (5α -DHT) pomocí enzymu 5α -reduktáza, typ 2 (SRD5A2) exprimovanému v kůži genitálu. Nedávno byla zjištěna alternativní cesta, tzv. „cesta zadními vrátky“ („backdoor pathway“; Auchus, 2004). Jedná se o syntézu 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diolu, který je prekurzorem dihydrotestosteronu (DHT) v cílových tkáních. Tato alternativa je esenciální pro maskulinizaci lidských plodů a není aktivována u myších plodů (Shima and Morohashi, 2017).

Druhou významnou populací (linií) Leydigových buněk jsou dospělé Leydigovy buňky, které vznikají z nediferencovaných **kmenových Leydigových buněk (SLCs)**. U hlodavců začíná jejich vývoj po

narození, u člověka před nástupem puberty. Několik faktorů je známo být zapleteno do diferenciaci (např. LH, DHH, PDGF α a cyklický adenosinmonofosfát – cAMP) a do proliferace (např. inhibiční faktor leukémie – LIF, PDGF, LH a cAMP) dospělých Leydigových buněk. Na rozdíl od FLCs je jejich diferenciaci na LH závislá. Produkce testosteronu zralou Leydigovou buňkou je nutná pro začátek puberty a pro nástup spermatogeneze. Během dospělého života jsou ALCs jako jediné zodpovědné za produkci testosteronu. Během stárnutí jeho produkce klesá až o polovinu (Landreh, 2014).

Byla popsána čtyři odlišná stádia vývoje linie dospělých Leydigových buněk: SLCs, PLCs, ILCs a ALCs. Tato posloupnost stádií je obvyklá nejen pro postnatální vývoj ALCs, ale i pro obnovení ALCs v dospělých varlatech, kde bylo množství Leydigových buněk zredukováno (např. chemicky nebo radiací; Chen et al., 2017). Testikulární tkáň totiž může být obnovena z populace kmenových buněk zahrnující kromě spermatogoniálních kmenových buněk (SSCs) i SLCs. SLCs jsou buňky vřetenovitého tvaru podobající se mesenchymálním buňkám (Obrázek 3 B.). Není úplně jasné, kde se ve varlatech nacházejí. Některé studie naznačují, že přebývají v intersticiálním prostoru varlat jako pericyty nebo buňky hladkého svalstva podél stěn cévních. Další studie spíše ukazují na peritubulární lokalizaci, tedy na mezenchymální buňky obklopující povrch semenotvorných kanálků (Chen et al., 2010). SLCs se diferencují záhy po narození (7. den u potkana) z progenitorových buněk, následně proliferují a zároveň se diferencují do dalšího stádia dospělých Leydigových buněk (Peak et al., 2016), SLCs exprimují receptor pro růstový faktor derivovaný z trombocytů (PDGFR α), receptor pro inhibiční faktor leukémie (LIFR) a gen pro tirozinkinázový receptor (c-KIT) a neexprimují LHR nebo 3 β -HSD (Chen 2017). PDGFR α se exprimuje ve všech stádiích vývoje dospělých Leydigových buněk, nejvíce u málo diferenciováných progenitorových buněk a u neonatálních peritubulárních buněk. U myši neexprimující mitogen PDGF α se nevyvíjí dospělá linie Leydigových buněk, což naznačuje, že PDGF α a PDGFR α hrají důležitou roli ve vývoji Leydigových buněk (Landreh, 2014).

PLCs představují další vývojový typ linie dospělých Leydigových buněk a objevují se ve vnější vrstvě semenotvorných kanálků a kolem cévních stěn 11.–28. den po porodu u potkana před třetím rokem věku u člověka (Landerh, 2014). PLCs disponují vysokou proliferační kapacitou, což slouží k vytvoření potřebného počtu ALCs ve varlatech. PLCs mají stále protažený a vřetenovitý tvar podobný kmenovým buňkám (Obrázek 3 B.) a také exprimují PDGFR α , LIFR a c-KIT, ale na rozdíl od SLCs exprimují také zkrácené formy LHR a AR a steroidogenní enzymy, jako jsou cytochrom P450 s cytochrom P450 se štěpícím postranním řetězcem (P450 $_{sc}$), 3 β -HSD (HSD3B1), P450 $c17$, 3 α -HSD (AKR1C14) a 17 β -HSD. Proto jsou PLCs schopny steroidogeneze a produkují jako hlavní androgen androsteron, nikoli testosteron (Stanley et al., 2013; Chen et al., 2010; Shima and Morohashi, 2017).

ILCs jsou prominentním typem Leydigových buněk ve varlatech mezi 28–56 dnem u potkana a mezi třetím až osmým rokem u člověka (Landerh, 2014). Vznikají z PLCs, které proliferují a zároveň

diferencují do ILCs. Během diferenciacce se PLCs postupně zvětšují, získávají kulatější tvar, snižují svou proliferaci kapacitu a ukládají více tukových kapének. Jejich počet dosáhne u potkana až 13–14 milionů buněk v každém varleti. ILCs mají tedy kulatý tvar a velké množství hladkého endoplazmatického retikula, obsahují v cytosolu velké množství tukových kapének (Obrázek 3 B.) a exprimují větší množství 3β -HSD, P450_{sc}c a P450_{c17}, čímž se zvyšuje kapacita pro produkci androgenů. Jelikož exprimují 3α -HSD a 5α -reduktázu, produkují zejména androstendiol (5 α -andro-stan-3 α , 17 β -diol). Vytvářející se ILCs se stěhují z peritubulární a perivaskulární oblasti k intersticiu, kde mohou v budoucnu zrát až do ALCs (Chen et al., 2010; Landreh, 2014).

ALCs se diferencují v době mezi 28. a 56. dnem u potkana a mezi 9. a 11. rokem u člověka a na konci diferenciacce (56. den u potkana, kolem 15. roku u člověka) tvoří dominantní typ Leydigových buněk ve varlatech (až 25 mil. buněk na varle u potkana; Landreh, 2014). Plně diferencovaná (zralá) ALCs se normálně nedělí, ale je možné, aby se regenerovaly z SLCs, pokud jsou (např. experimentálně) eliminovány (Chen et al., 2017). ALCs jsou kulaté a obsahují mitochondrie a velké a kulaté jádro s kondenzovaným euchromatinem a jedno až dvě jadérka (Obrázek 3 B.). Ve srovnání s ILCs mají větší množství endoplazmatického retikula, ale velmi redukovaný obsah tukových kapének. Jak postupně dozrávají ALCs z ILCs, tak se snižují aktivity enzymů metabolizujících androgeny. ALCs exprimují plně funkční LHR a AR a steroidogenní enzymy, jako jsou 3β -HSD, 3α -HSD, and 17β -HSD. Později exprimují také 11β -HSD, typ 1. Jak se snižuje androgenní metabolismus a pokračuje nárůst hladin steroidogenních enzymů produkujících testosteron, tak začíná převažovat množství testosteronu nad množství produktů 5α -redukce. V případě ALCs u potkana starého 90 dní je produkce testosteronu 150krát vyšší, než byla u PLCs ve 21. dnu a 5krát vyšší než u ILCs ve 35. dnu po narození (Chen et al., 2017). ALCs se formují v době dospívání a produkují požadované množství testosteronu pro spermatogenezi a udržení reprodukčních funkcí a sekundárně pohlavních znaků. ALCs převažují v populaci Leydigových buněk v pohlavně zralých varlatech a jejich markerem jsou LHR a INSL3 (Zhang et al., 2008).

2.2.2 Zdroje Leydigových buněk

Jako zdroje Leydigových buněk se ke studiu testikulárního systému a jeho regenerace *in vitro* nebo k hodnocení testikulární toxicity pomocí modelů *in vitro* nejčastěji využívají savci, zejména myši nebo potkani, ale také prasata nebo býci (Reis et al., 2015). Zřídka se získávají i z člověka, jelikož jsou s tím spojeny lékařské a etické problémy, i limitace množství a kvality materiálu. Pokud se pro kultivaci *in vitro* dá přednost buňkám pocházejícím ze zvířat, získané výsledky jsou pak relevantní spíše pro *in vivo* situaci stejného živočišného druhu. Při extrapolaci výsledků na člověka je situace značně ztížená mezidruhovými rozdíly (Reis et al., 2015).

Pokud jsou buňky použity hned po izolaci z čerstvých varlat, tak se nazývají **primární kultury** Leydigových buněk. Jejich výhodou je, že nesou v době izolace charakteristiky a rysy Leydigových buněk *in situ* a reprezentují nejdokonalejší zdroj daného typu Leydigových buněk. Nevýhodou je jejich krátká životnost, lze je udržovat v kultuře pouze po omezenou dobu (záleží na vývojovém typu Leydigových buněk a jeho proliferačním potenciálu – s vyšším stupněm diferenciací se snižuje jejich proliferační kapacita a omezuje se jejich životnost a dochází k jejich senescenci). Během 2D kultivace (buňky rostou ve dvourozměrném uspořádání, tvoří monovrstvu) také rychle ztrácejí diferenciační charakteristiky, které nesou *in vivo*, dochází k tzv. dediferenciaci (Rouiller-Fabre et al., 1998). Ke kultivaci *in vitro* lze získat primární kultury FLCs (McDowell et al., 2012) i všech postnatálních vývojových typů Leydigových buněk – SLCs, PLCs, ILCs a ALCs (Chen et al., 2007). Je velice omezený zdroj lidských primárních Leydigových buněk. Lidské primární ALCs byly izolovány z donorů např. podstupujících oboustrannou orchiektomii (odstranění varlat; Bilinska, 2009), naproti tomu lidské primární ILCs byly získány velmi vzácně (Baert, 2017).

Alternativu primárních kultur představují **kontinuální buněčné linie** nádorových buněk nebo spontánně či cíleně immortalizovaných primárních buněk. Nádorové buňky a z nich vzniklé linie Leydigových buněk bývají izolované z tumoru Leydigových buněk (např. myši MA-10 linie/ ATCC® CRL-3050™, mLTC-1 linie/ ATCC® CRL-2065™, I-10/ ATCC® CCL-83™ a BLTK1 (Forgacs et al., 2012) a potkaní R2C linie/ ATCC® CCL-97™) a v kultuře se dělí neomezeně a nedochází k jejich senescenci. Problém je, že si udržují charakteristiky nádoru, ze kterého vznikly, a jsou charakteristické genetickou nestabilitou (Mather et al., 1982). Immortalizované buněčné linie z primárních Leydigových buněk se mohou dělit neomezeně, navíc si zachovávají většinu důležitých vlastností primárních buněk (Mather et al., 1982). Immortalizované buněčné linie Leydigových buněk představují snadno dostupný a levný zdroj buněk (Reis et al., 2015), používány jsou linie např. myši TM3/ ATCC® CRL-1714™ a potkaní LC-540/ ATCC® CCL-43™. TM3 buňky představují model ILCs a LC-540 buňky představují model ALCs. Kontinuální buněčné linie kultivované dlouhodobě *in vitro* a jejich opakované dělení může u těchto buněk způsobit ztrátu některých vlastností typických pro dané buňky *in situ* v době izolace. U kontinuálních linií Leydigových buněk dochází k postupné ztrátě nebo poklesu schopnosti produkce androgenů (Engeli et al., 2018).

Embryonální kmenové buňky (ESCs) jsou izolované z časného embrya ve stádiu blastocysty, přesněji z embryoblastu (ICM – „inner cell mass“). Jsou pluripotentní, tedy mají schopnost se diferencovat do všech typů buněk v lidském těle. Navíc díky vysoké aktivitě enzymu telomerázy je možné tyto buňky kultivovat *in vitro* jako buněčnou linii bez potřeby immortalizace. ESCs jsou schopny diferencovat do buněčných typů všech třech embryonálních zárodečných listů (ektoderm, mesoderm a endoderm; Kock et al., 2012). Vytvořené buňky by bylo možné použít v regenerační medicíně, ovšem problém může představovat imunitní odpověď organismu. Problém ESCs je jejich vysoká genomová

nestabilita a možná teratogenita, navíc se jedná o velmi kontroverzní zdroj buněk, protože po vyjmutí buněčné masy (embryoblastu) dochází k destrukci embrya (Gajdoš, 2016). Na rozdíl od využití ESCs pro tvorbu funkčních typů buněk jater, srdce nebo nervového systému, kdy existují definované protokoly jak pro myši, tak pro lidské ESCs, byly myši, potkaní nebo lidské ESCs velice omezeně využity jako zdroj různých typů testikulárních buněk (Liebert, 2015). Existuje pouze pár studií, které se zaměřily na myši nebo lidské embryonální kmenové buňky jako zdroj pro tvorbu Leydigových buněk. Výsledkem byly pouze buňky podobající se Leydigovým buňkám, které produkují androgeny velice omezeně a mají velice limitovanou steroidogenní kapacitu (Sonoyama et al., 2012).

Kromě ESCs existují v různých tkání dospělých jedinců tzv. **dospělé kmenové buňky (ASCs)**, které představují z etického hlediska méně kontroverzní typ kmenových buněk. Jejich hlavní funkcí v organismu je udržovat počet příslušných buněk a obnovovat (regenerovat) obývané tkáně. ASCs jsou nejčastěji izolovány z kostní dřeně, pupečnickové krve, mozku nebo tuku. Dospělé kmenové buňky bývají označovány dle původu, tedy obývané tkáně (kmenové buňky z pupečnickové krve a plodové vody a orgánové kmenové buňky). Mesenchymální kmenové buňky jsou multipotentní, schopné obnovovat poškozené mezenchymální a krvetvorné tkáně. Mohou diferencovat do širokého spektra buněčných typů, jako je chondrocyt, adipocyt, osteocyt, osteoblast, myocyt, kardiomyocyt, neuron či inzulin produkující buňka (Yazawa et al., 2006). Myši nebo lidské mesenchymální kmenové buňky z kostní dřeně, tukové tkáně nebo pupečnickové krve byly studovány jako „nezávadný“ zdroj buněk pro diferenciaci do steroidogenních buněk podobajícím se Leydigovým buňkám, zejména pro využití v regenerační medicíně (Gondo et al., 2008). Tyto typy kmenových buněk mají potenciál diferencovat do různých typů steroidogenních buněk, avšak podobně jako u ESCs v žádné v této studii nebyly schopny vytvořit mitoticky aktivní Leydigové buňky a steroidogenní potenciál výsledných buněk byl velice omezený (Peak et al., 2016). Některé studie se zaměřily na využití přímo SLCs pro *in vitro* diferenciaci do dospělé linie Leydigových buněk (Odeh et al., 2014). Velkou nevýhodou oproti dospělým kmenovým buňkám z plodové vody nebo tukové tkáně (Yazawa et al., 2006) je to, že SLCs se velmi těžko získávají a dostupné izolační protokoly nejsou moc úspěšné, zejména u člověka (Zhang 2008). Vývoj *in vitro* diferenciačních protokolů je také na začátku a je potřeba dalších výzkumů, aby se zdokonalil a vedl k Leydigovým buňkám se steroidogenní kapacitou podobající se všem vývojovým typům Leydigových buněk (Peak et al., 2016).

Jakoukoli somatickou buňku v těle je teoreticky možné využít pro přípravu uměle vytvořených kmenových buněk. Tyto přeprogramované buňky se nazývají **indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs)** a podobné jako embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní, je tedy možné z nich následně vytvořit jakoukoli buňku. Mají aktivní telomerázu a jsou schopny se diferencovat do všech buněčných typů třech zárodečných listů (Kock et al., 2012). Lze je snadno získat, ke vzniku iPSCs se nejčastěji využívají fibroblasty kvůli snadné dostupnosti, navíc vytvoření iPSCs se nepotýká s takovými

etickými problémy jako v případě ESCs. Velký potenciál představují iPSCs pro regenerativní medicínu (Sonoyama et al., 2012). Bohužel výtěžnost buněk při přípravě je stále nízká, navíc někdy jsou iPSCs tvořeny pomocí virů, což by mohlo mít za následek vznik nádoru (Gajdoš, 2016). Myši i lidské fibroblasty byly použity pro přímé reprogramování vedoucí k buňkám podobajícím se dospělým Leydigovým buňkám (Yang et al., 2017). Výsledné buňky exprimovaly steroidogenní enzymy a produkovaly testosteron. Dokonce Sertoliho buňky byly reprogramovány na buňky podobající se fetálním Leydigovým buňkám (Zhang et al., 2015). Je však potřeba prozkoumat jejich stabilitu během dlouhodobé kultivaci a využitelnost těchto reprogramovaných Leydigových buněk v toxikologii.

2.3 3D modely testikulárních buněk

Testikulární buňky jsou kultivovány *in vitro* již po mnoho let. Konvenční kultivace buněk ve 2D systému pomáhala porozumět komplexní fyziologii buněk, tedy jak buňky fungují a jak reagují na různé stimuly, ale příliš nepřipomínají skutečnou situaci v *in vivo* prostředí. Kultivace buněk v klasickém 2D pojetí nese totiž mnoho limitací. Omezená je expanze buněk rostoucích na kultivační misce, buňky tvoří monovrstvu, nemají rozlišenou apikální a bazální stranu a jejich tvar je zploštělý. Kmenové buňky navíc ztrácí schopnost diferenciaci (Saldutti et al., 2013). Co se týká testikulárního systému, napodobit třeba celý proces spermatogeneze a dojít až ke zralé zárodečné buňce je v tradičním 2D systému prakticky nemožné (Sadri-Ardekani et al., 2017). Dvoukomorový kultivační systém, který umožňoval kultivovat více typů buněk a sledovat parakrinní komunikaci mezi buňkami a vzájemné ovlivňování, představoval jisté zlepšení, ačkoli buňky jsou kultivovány stále ve 2D uspořádání. Dalším posunem bylo zavedení extracelulární matrix (komerční název Matrigel), která věrněji imituje *in vivo* prostředí (Saldutti et al., 2013).

Buňky kultivované ve 3D systému znamenají velké přiblížení se přirozenému a komplexnímu prostředí, ve kterém se buňky vyskytují v živém organismu. Povrch buněk je vystaven extracelulární matrix nebo sousedním buňkám, což také dovoluje buňkám mezi sebou komunikovat a interagovat. Buňky mají tvar mnohorozměrný. Navíc kultivace ve 3D systému umožňuje udržovat systém až desítky dní (Saldutti et al., 2013). Je však známo, že optimální podmínky prostředí pro 3D kultivaci se liší podle typu kultivovaných buněk. (Ravi et al., 2015). Také u testikulárních tkání a pro lepší pochopení složitého mechanismu spermatogeneze a fungování testikulárních buněk jsou využívány kultivace více typů buněk v trojrozměrné struktuře. Ve 20. století vznikaly první metody kultivace testikulárního systému v 3D uspořádání a jedna z prvních aplikovaných metod byla kultivace buněk s použitím extracelulární matrix nebo agaru. Např. primární pre-pubertální testikulární buňky z potkanů a selat nebo přímo kousky disociované testikulární tkáně byly kultivovány v podpůrné extracelulární matrix, na agarovém

bloku nebo na kůži imunodeficitních myši a došlo k *de novo* formování semenotvorných kanálků (Alves-Lopes et al., 2017, Yokonishi et al., 2013).

Kultivace homogenních buněčných linií nenapodobuje příliš prostředí v *in vivo* tkáních, což se ukázalo limitující zejména pro proces spermatogeneze (Ravi et al., 2015), takže bylo potřeba vyvinout způsob kultivace více buněčných typů najednou, tedy **ko-kultivaci**. Výsledkem je systém s lepší obsáhlostí složitosti systému (Ravi et al., 2015). Společně byly např. kultivovány Leydigovy a Sertoliho buňky z 25. dní starého potkana, které během 3–4 dní 2D kultivace vytvořily monovrstvu. Sertoliho buňky vytvářely kanálkovou strukturu podobně jako v prostředí *in vivo* (Bilinská, 1989). Leydigovy buňky v ko-kultuře produkovaly více estradiolu než Leydigovy buňky kultivované samostatně. Sertoliho buňky zase produkovaly více 17 β -estradiolu. Tento rozdíl byl ještě v ko-kultuře podpořen, pokud byl přidán FSH, což neplatilo pro buňky kultivované odděleně.

Snad nejčastěji se ko-kultivační model využívá pro testikulární systém k napodobení procesu spermatogeneze, kdy jsou společně kultivovány minimálně Sertoliho a zárodečné buňky. Kromě primárních kultur jednotlivých testikulárních typů buněk byly kultivovány i fragmenty testikulárních tkání získané z myši nebo potkana, kdy byly přítomny i např. peritubulární myoidní buňky. Po 2–4 týdnech kultivace těchto fragmentů bylo možné pozorovat buněčné struktury podobné vláknům tvořených peritubulárními a Sertoliho buňkami, což svědčilo o vytvoření podmínek, které umožňují spontánní rekonstrukci mikroprostředí *in vitro* pro testikulární buňky (Mäkelä et al., 2014). Sato et al. (2011) se s využitím fragmentů testikulární tkáně (kultivované v médiu bez séra) vytvořit funkční spermie *in vitro*, ze kterých poté vznikly zdravé myši.

Wegner et al. (2013) vytvořil protokol pro přípravu 3D modelu ko-kultury potkaních varlat využívající extracelulární matrix (Matrigel), která pokrývá kultivované buňky (Wegner et al., 2013). Model je založen na ko-kultivaci nezralých neonatálních Leydigových, Sertoliho a zárodečných buněk z 5 dní starého potkana „obalené“ (overlay) extracelulární matrix (Matrigel), což výrazně zlepšilo přilnavost buněk, jejich životaschopnost a mezibuněčnou komunikaci. Tento model byl též použit pro rozlišení reprodukční toxicity aktivních a neaktivních ftalátů a pro stanovení křivky dávka-odpověď pro kadmium (Wegner et al., 2013).

Trojrozměrná struktura v *in vitro* modelech znamená přiblížení se prostředí *in vivo*. V současnosti existuje mnoho 3D modelů umožňujících zkoumat jeden typ testikulárních buněk, nebo více typů kultivovaných dohromady. Mezi pokročilé 3D modely patří modely využívající lešení („scaffold“), multicelulární sféroidy, mikronosiče, bioreaktory, organotypické explantáty, organoidy, mikrofluidní zařízení a další. K podrobnějším popisům byly vybrány jen některé 3D modely, především ty, které byly využity pro 3D modely testikulárního systému.

Multicelulární sféroidy mají složitou architektonickou strukturu. Pro utváření a kultivaci buněčných agregátů je možno použít např. kultivaci na deskách s nepřilnavým povrchem, metodu visící kapky („hanging drop“), nebo agitační míchání (bioreaktor; Cimr, 2017). Využít lze i hybné síly, např. gravitační sílu (mikrogravitace), magnetickou či elektrickou sílu nebo akustické vlnění (Cui et al., 2017). Ke vzniku sféroidu dochází ve třech krocích. Prvním je přiblížení rozptýlených buněk k sobě, kdy vytvoří volné agregáty díky kontaktu extracelulární matrix a integrinů na povrch buněk. Kontakt buněk následně vyvolá expresi kadherinu, který se hromadí na povrchu buněk. Ve třetí fázi vytvoří buňky pevný agregát (kompaktní sféroid) díky intrakci kadherinů. Také mezibuněčné adhezivní proteiny konexiny a panexiny ovlivňují kontakt buněk a přispívají k vytvoření sféroidu (Cui et al., 2017). Výhodou tohoto 3D modelu je rychlé provedení nenákladnost přípravy a kultivace, jelikož není třeba žádný nosič nebo lešení. Výhodou je i možnost miniaturizace a automatizace procesu testování toxicity chemikálií (Page et al., 2013). Při použití nádorových buněk se vytváření onkosféry, které se využívají pro výzkum růstu a chování tumoru a jeho citlivosti vůči chemoterapeutikům. Problémem je, že během dlouhodobé kultivace může vznikat hypoxické prostředí uvnitř sféroidu, tzv. nekrotické jádro (Page et al., 2013; Haycock et al., 2011). Bylo otestováno již více než 380 buněčných linií pro jejich schopnost vytvořit sféroid a udržet sférický tvar, přičemž každá buněčná linie tvořila sféroidy různého tvaru a velikosti, který by mohly být označeny na kompaktní, těsné či volné agregáty (Baek et al., 2016). Omezeně byly kultivovány i 3D sféroidy testikulárních buněk (Sertoliho, Leydigovy buňky; Cirelli et al., 2017).

Organoid představuje zjednodušený trojrozměrný orgán vypěstovaný *in vitro*, který vznikl kóultivací jednotlivých typů buněk reprezentující požadovaný orgán. Používají se primární nebo nádorové buňky, též buněčné linie nebo kmenové či progenitrové buňky. Z kmenových buněk izolovaných z tkáně embrya nebo z dospělého jedince je možné vypěstovat organoid vlastní jedinci, ze kterého byla tkáň odebrána (Simian and Bissel, 2016). Buňky tvořící organoid jsou schopny sebeobnovování (součást kmenové buňky) a sebeorganizace (www.sigmaaldrich.com). Vzniklý organoid lze uchovávat zmrazený tekutým dusíkem (kryoprezervace) a v případě potřeby znovu rozmrazit a použít, aniž by došlo omezení proliferační nebo funkční kapacity buněk (Sadri-Ardekani et al., 2017). Takto už byly vytvořeny organoidy reprezentující mnoho orgánů, např. mozek, játra, ledviny, sítnice oka, části trávicí soustavy atd. Organoidy se také stávají základy buněčných modelů různých nemocí (Nature methods, 2018). Představují velký přínos pro personalizovanou medicínu, kdy je možné si vytvořit organoid daného orgánu z vlastních buněk (Freedman et al., 2015). Hodnotné jsou i pro hodnocení vlivu látek, představují totiž relevantní a komplexní *in vitro* model daného orgánu vytvořený z lidských buněk (www.sigmaaldrich.com). Ovšem příprava organoidu je velmi časově i finančně náročná, je třeba pečlivě kontrolovat podmínky kultivace, metoda není zatím úplně vhodná pro HTS. Může se potýkat i s etickými problémy, obzvláště jsou-li součástí i ESCs (Clevers et al., 2017).

Ačkoli organoid znamená velké přiblížení se podmínkám *in vivo*, představuje stále jen malou část celého komplexního organismu.

Organoid reprezentující testikulární systém byl sestaven pomocí třívrstevného gradientového systému využívajícího Matrigel („three-layer gradient system“) z testikulárních buněk izolovaných z potkaních varlat 5–8, 20 a 60 dní po porodu (Alves-Lopes et al., 2017). Tento *in vitro* model věrně imituje uspořádání somatických a zárodečných buněk v prostředí *in vivo*, má funkční BTB a je schopen podpořit proliferaci zárodečných buněk. Kromě toho bylo v tomto modelu potvrzeno, že kyselina retinová (RA) pomáhá udržovat zárodečné buňky (Alves-Lopes et al., 2017).

Dalším úspěšným *in vitro* testikulárním modelem napodobujícím proces spermatogeneze byl *in vitro* model multicelulárního organoidu z lidských SSCs, Sertoliho a Leydigových buněk. Tento model byl schopen kultivace po dobu 4 týdnů. Během kultivace byla sledována významná produkce markerů spermatogeneze („spermatogenic“) jako DAZL („deleted in azoospermia-like“), protein pro regulaci aktivity cytoskeletu (ACR) a protamin 1 (PRM1), stejně jako markeru funkčních Leydigových buněk HSD3B1 a markeru funkčních Sertoliho buněk FSHR. Organoidy také produkovaly androgeny jako odpověď na stimulaci hCG (Sadri-Ardekani et al., 2017).

Orgánové explantáty jsou tvořeny částí tkáně izolované z odebraného orgánu nebo celým izolovaným orgánem. Buňkám je umožněno růst na živé tkáni a zachovávat si původní architekturu tkáně i mezibuněčnou komunikaci. Jedná se tedy o relevantní metodu k hodnocení účinků chemických látek, protože simuluje prostředí *in vivo* (Haycock et al., 2011). Bohužel jakékoli tkáně nebo orgány bývají špatně dostupné, obzvláště lidské. Navíc se jedná o nákladnou metodu, která vyžaduje pečlivou kontrolu kultivačních podmínek (Page et al., 2013; Haycock et al., 2011) a možnosti robotizace a automatizace jsou omezené.

Sato et al. (2015) využili model orgánového explantátu pro napodobení procesu spermatogeneze *in vitro*. Použili ke kultivaci fragmenty z varlat 4–29 týdnů staré myši. Byly použity transgenní myši *Gsg2-GFP*, jejich zárodečné haploidní buňky exprimovaly zelený fluorescenční protein (GFP) a svítily zeleně. Testikulární buňky během kultivace *in vitro* produkovaly GFP, což dokazuje přítomnost haploidních buněk (spermatocytů a spermatid). Také byly použity fragmenty z varlat 13–21 týdnů starých myši s deficitem vitamínu A obsahující pouze spermatogonia. Během kultivace se projevila exprese GFP, což značilo, že spermatogeneze probíhala (potvrzeno i histologicky). Orgánový explantát se tedy dá využít pro započetí i udržení spermatogeneze (Sato et al., 2015).

Mikrofluidní zařízení je systém s cirkulujícím médiem, které přivádí do systému živiny a kyslík a odvádí odpadní metabolity, tedy simuluje krevní řečiště organismu. Mikrofluidní systém znamená krok blíže k simulaci *in vivo* podmínek i pro testikulární systém, např. zvyšuje účinnost spermatogeneze a pomáhá tento proces udržovat až několik měsíců (Komeya et al., 2017). Nevýhodou je složitost zařízení a nutnost udržování průtoku média, které zajišťuje silové čerpadlo (Komeya et al., 2017).

Komeya et al. (2016) se snažili pomocí mikrofluidního zařízení dlouhodobě udržet spermatogenezi *ex vivo*. Použité fragmenty testikulární tkáně pocházely z varlat čerstvě narozených myší (0,5–5,5 dní po porodu). Semenotvorné kanálky tedy obsahovaly pouze gonocyty (prvopohlavní buňky) a prekurzory pro spermatogonia. Tyto myši byli transgenní *Acr-GFP* myši. Záradečné meiotické buňky těchto myší exprimují GFP, který se následně akumuluje v akrozomech spermatid. V mikrofluidním systému oddělovala porózní membrána testikulární tkáň od proudícího média. Spermatogenezi se podařilo udržovat 6 měsíců, navíc tkáň produkovala testosteron a odpovídala na stimulaci LH. Toto mikrofluidní zařízení úspěšně napodobilo podmínky *in vivo*, ve kterých testikulární tkáň udržuje své fyziologické funkce a homeostázu.

3. Využití pokročilých modelů testikulárních buněk v toxikologii

Pokročilé 3D modely testikulárních buněk mají široké uplatnění od studia nenarušeného testikulárního systému, před studium jeho patologií až po jejich využití v regenerativní medicíně. Umožňují lépe porozumět složitým mechanismům, které v testikulárním systému probíhají, pozorovat vzájemnou spolupráci testikulárních buněk a komunikaci mezi nimi. Pokročilé 3D modely testikulárního systému mohou být také velmi nápomocné při vývoji nových léčiv a při hodnocení jejich účinků na testikulární systém. V neposlední řadě představují relevantnější systém hodnocení testikulární toxicity chemických látek a jejich směsí v porovnání s minulostí. V této kapitole jsou shrnuty limitované studie, ve kterých byla za pomoci pokročilých 3D modelů testikulárního systému hodnocena testikulární toxicita známých environmentálních kontaminantů.

Pomocí orgánového explantátu varlat potkana byla hodnocena testikulární toxicita známého endokrinního disruptoru bisfenolu A (BPA; Goncalves et al., 2018), který je spojován s předčasnou vyspělostí (Chen et al., 2018). Dospělí potkani byly ošetřeni tzv. etylen dimethansulfonátem (EDS), což je toxikant, který selektivně zabíjí Leydigovy buňky. V těchto varlatech pak vznikají nové Leydigovy buňky z LSCs. Z takto ošetřených varlat byly izolovány semenotvorné kanálky, které byly fragmentovány a každý fragment byl kultivován po dobu až 2 týdnů na 12jamkové desce s málo přilnavým povrchem. V tomto 3D modelu bylo zjištěno, že BPA neovlivňuje proliferaci LSCs *in vitro*, ale stimuluje diferenciaci LCSs (produkce testosteronu, zvýšení exprese specifických markerů *Lhr*, *Cyp11a1*, *Hsd3β1*, *Cyp17a1*, *Hsd17β3*). Výsledky byly potvrzeny *in vivo*. Tedy BPA může navozovat předčasnou pubertu u samců stimulací předčasně diferenciaci LCSs (Chen et al., 2018).

Pomocí 3D modelu testikulárních buněk byl zkoumán i vliv simulované mikrogravitace na sféroidy vytvořené ze Sertoliho buněk (primární myší buňky) v bioreaktoru. Simulovaná mikrogravitace neovlivnila životaschopnost, proliferaci Sertoliho buněk ani expresi cytoskeletálních proteinů a růstových faktorů (Kit ligand), ovšem zvýšila produkci aromatázy, což následně vedlo ke zvýšení sekrece

17 β -estradiolu. Vysoké množství 17 β -estradiolu způsobené mikrogravitací by mohlo mít nepříznivý vliv na reprodukci a vést ke vzniku nádoru varlat a být rizikem pro mladé astronauty (Cirelli et al., 2017).

Ko-kultivační modely posloužily k hodnocení účinku různých chemikálií na proces spermatogeneze a na funkce zapojených somatických a spermatogoniálních buněk. Pokročilý 3D ko-kultivační model potkaních testikulárních buněk byl použit pro hodnocení testikulární toxicity známého inhibitoru enzymu histon deacetylázy HZ1006 po dlouhodobé expozici (až 24 dnů; Zhang et al., 2018). HZ1006 způsobil inhibici proliferace, snížení produkce testosteronu, pokles exprese proteinů specifických pro zárodečné buňky v meiotické fázi, pokles exprese AR a jednoho z genů závislého na aktivaci AR, tzv. prostatického specifického antigenu PSA (Prostate Specific Antigen; (Zhang et al., 2018).

Na *in vitro* model ko-kultivační testikulárního organoidu 3D-TCS složeného z nezralých testikulárních buněk (Sertoliho, Leydigovy a zárodečné buňky izolované 5. den po porodu) pokrytých extracelulární matrix byl využit k hodnocení testikulární toxicity metabolitů ftalátů (Harris et al., 2015) a metabolismu ftalátů toxických pro vývoj DBP a DEP ve varlatech (Harris et al., 2016). Vývojově toxické ftaláty (DTPE) se ukázaly být testikulárně toxické přes vliv na steroidogenezi a na vývoj testikulárních buněk. Naproti tomu vývojově netoxické ftaláty (DNTPE) nebyly testikulárně toxické a neovlivňovaly ani steroidogenezi, ani vývoj varlat (Harris et al., 2016), což bylo potvrzeno v dalším pokročilém 3D *in vitro* modelu 3D-SGC („Sertoli cell/gonocyte co-culture“ – nezralé Sertoliho buňky a spermatogonia A izolované 5. den po porodu pokryté extracelulární matrix; Yu et al., 2009) i *in vivo* (Harris et al., 2015). Byla charakterizovaná i metabolická kapacita 3D-TCS modelu včetně kinetiky testikulární toxicity ftalátů. 3D-TCS model se ukázal být schopen metabolické aktivity (funkční lipázy a enzymy CYP450 - Cyp11a1, Cyp17a1, Cyp19a1, Cyp26b1) a metabolizovat ftaláty. Tento model je schopen poskytnout informace i o kinetice působení hodnocených sloučenin, což zlepšuje interpretaci výsledků získaných z *in vitro* testikulárních modelů (Harris et al., 2016).

3D ko-kultivační model složený z potkaních testikulárních buněčných linií (spermatogoniální, Sertoliho a Leydigovy buňky) a extracelulární matrix byl využit k hodnocení abnormalit testikulárních buněk během vývoje (Yin et al., 2017). Model měl 3D strukturu a vytvořilo se v něm prostředí podobné *in vivo* situaci, navíc v něm systému probíhala spermatogeneze. Výsledky z tohoto modelu dokázaly odlišit známě reprodukčně toxické látky od těch nereprodukčně toxických a získání IC₅₀ silně korelovaly s výsledky získanými *in vivo*. Tento model by měl být využit pro screening reprodukčně toxických látek a pro jejich prioritizování pro následné podrobnější hodnocení (Yin et al., 2017).

Důležitým cílem testikulárních toxikantů je bariéra BTB, proto by bylo dobré mít i vhodný *in vitro* model mimikující BTB pro hodnocení reprodukční toxicity látek. Vhodný 3D eBTB („engineered blood-testis barrier“) je založen na 3D kultuře testikulárních buněk (izolovaných z varlat 18 dnů starých potkanů) kultivovaný v dvoukomorovém systému. Peritubulární buňky byly kultivovány dole ve spodní

komoře. Nahoře na insertu byla kultivována směs Sertoliho a zárodečných buněk pokrytá umělou extracelulární matrix, což napodobuje základnu BTB *in vivo* (Legendre et al., 2010). Funkčnost tohoto modelu byla potvrzena přítomností proteinů těsných spojů mezi Sertoliho buňkami (např. claudin 11). Měření trans-epiteliálního elektrického odporu potvrdilo vztah mezi Sertoliho buňkami, peritubulárními buňkami a matrix, což bylo ovlivněno i těsnými spoji vnikajícími mezi Sertoliho buňkami během kultivace. Zárodečné buňky se diferencovaly, vznikaly haploidní zárodečné buňky. Tento model je vhodný ke sledování funkce BTB a spermatogeneze a k hodnocení vlivu testikulárních toxikantů na BTB a spermatogenezi (Legendre et al., 2010).

Experimentální část

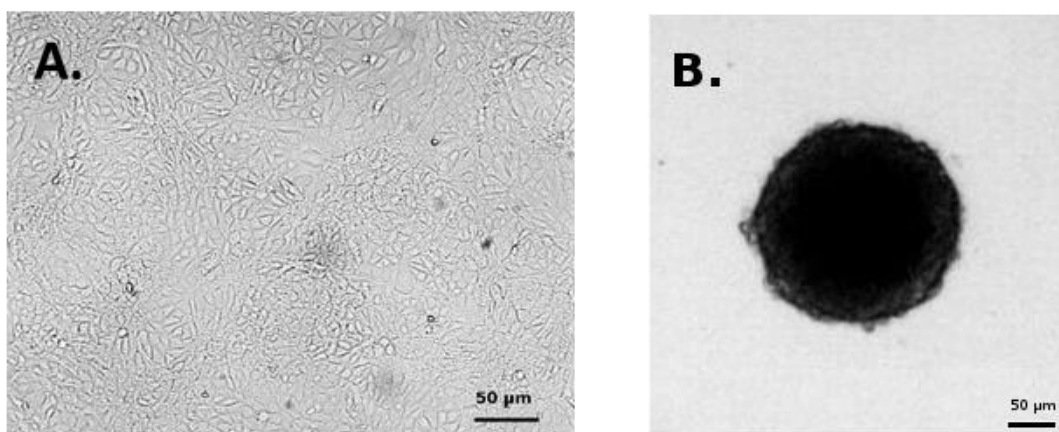
Práce se zaměřuje na využití jednoho z pokročilých 3D modelů při hodnocení testikulární toxicity látek, a to na mnohobuněčné sféroidy tvořené Leydigovými buňkami. Prvním krokem byla optimalizace podmínek kultivace sféroidů – tvorba gelu a podmínky a složení média. Aby bylo možno posoudit i vliv látek na životaschopnost Leydigových buněk tvořících sféroid, byla pro 3D kulturu Leydigových buněk optimalizována metoda využívající resazurin, který je metabolizován živými buňkami. Po optimalizaci byl model využit k hodnocení vlivu vybraných chemických látek na velikost a tvar sféroidů Leydigových buněk a na jejich životaschopnost.

4. Materiál a metody

4.1 Použitá linie buněk

Charakteristika linie Leydigových TM3 buněk (Obrázek 4):

- samčí epiteliální buňky izolované z varlat nedospělé myši (*Mus musculus*) kmene BALB/c nu/+
- zakoupeny z ATCC – Americká sbírka typových kultur („American Type Culture Collection“; , kat. č. CRL-1714™)
- optimální ředění pro kultivaci: 1:20 až 1:100,
- doba zdvojení: 18-22 h (závisí na koncentraci nasazených buněk: $0,4 \times 10^6$ – $1,8 \times 10^6$ b/cm²)



Obrázek 4: Leydigovy TM3 buňky kultivované v monovrstvě v běžné kultivační láhvi (2D systém); (A.) a jako mnohobuněčný sféroid v 3D Petri Dish® (B.).

4.2 Kultivace a pasážování Leydigových TM3 buněk

4.2.1 Materiál

- Kultivační médium:

Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium (DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Médium) a Hammovo médium F12 (Ham's F12 médium) v poměru 1:1 (DMEM/F12 red; Sigma, kat. č. D6421) obsahující pufrující složky HEPES (kyselina 4-2-hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonová; 15mM) a NaHCO_3 (15 mM) s přidavkem 5% v/v koňského séra (HS; PAA, kat.č. B15-021), 2,5% v/v fetálního bovinního séra (FBS; Biochrom FBS Superior, kat. č. S0615) a 2,5mM L-glutaminu (Biosera, kat. č. XC-T1715).

- Trypsin: 0,25% w/v Trypsin-EDTA
- PBS – Pufrovaný fyziologický roztok, obsahující 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ a 1,47mM KH_2PO_4 (pH 7,2)
- Sterilní kultivační nádoby pro tkáňové kultury (TPP)
- Sterilní pipety a mikropipety, sterilní plastové Pasteurovi pipety
- Cellometer Auto T4 Bright Field Cell Counter (BioTek)

4.2.2 Pasážování a kultivace buněk

Kultivační médium se před použitím nechalo vytemperovat na teplotu 37°C. Pod mikroskopem byla zkontrolována morfologie buněk a vyloučila se přítomnost kontaminace. Biohazardní box byl před prací vysterylizován germicidní lampou po dobu alespoň 15 min a pracovní plocha v něm byla otřena 70% EtOH. Otřeno 70% EtOH bylo i vše, co bylo do boxu umístěno. Hrdla lahví se před otevřením vždy ožehla plamenem. Buňky byly pasážovány před dosažením 100% konfluency, tedy nepokrývaly celý povrch kultivační nádoby (kultivační plocha 25 cm²), ale 70-90 % plochy. Staré kultivační médium bylo odsáto z kultivační nádoby, buňky byly opláchnuty PBS (3 ml, 2× opakováno). Do kultivační nádoby byl k buňkám přidán trypsin (0,5 ml), který rozvolňuje adherentní buňky narostlé v monovrstvě a odlepuje je ode dna kultivační nádoby, a buňky byly inkubovány při 37°C po dobu 2–3 min (nejdéle 5 min; mikroskopická kontrola – zakulacení buněk a jejich uvolnění do média). Následně bylo potřeba trypsin inaktivovat přidáním kultivačního média (3 ml). Opakovaným pipetováním byly buněčné shluky rozvolněny na jednotlivé buňky. 20 µl buněčné suspenze bylo přeneseno do počítací komůrky přístroje Cellometr a byl spočítán počet buněk. Poté se $0,5 \times 10^6$ buněk přeneslo do nové kultivační nádoby se 7 ml čerstvého kultivačního média (optimální ředění při kultivaci je dle ATCC 1:20 až 1:100) a buňky byly

kultivovány v inkubátoru s 5% CO₂, 95% vlhkostí a teplotou 37°C. Každý druhý nebo třetí den bylo nutné vyměnit staré médium za čerstvé, buňky byly pasážovány minimálně jednou týdně.

4.3 Vytváření mnohobuněčných sféroidů metodou 3D Petri Dish®

Technika 3D Petri Dish® umožňuje kultivaci buněk ve 3D uspořádání, nevyžaduje použití žádného buněčného „lešení“ a pomáhá napodobit přirozenou architekturu a funkce tkání *in vivo*. Zlepšuje mezibuněčné interakce, příjem živin a odstraňování metabolických látek produkovaných buňkami, což jsou procesy, které v 2D monovrstvě buněk neprobíhají zcela uniformně. Pomocí speciálních formiček ve formátu „24–35 – Large Spheroids“ jsou vytvořeny malé agarózové gely nazývané 3D Petri Dish®, ve kterých se kultivují buňky (Obrázek 5). Agaróza je neadhesivní substrát neumožňující přisednutí buněk, díky čemuž se buňky spontánně shlukují do 3D struktur, ve kterých probíhají komplexnější interakce mezi buňkami. Použitý typ formičky umožňuje vytvoření 35 sféroidů v každé jamce 24jamkové kultivační desky.

4.3.1 Materiál

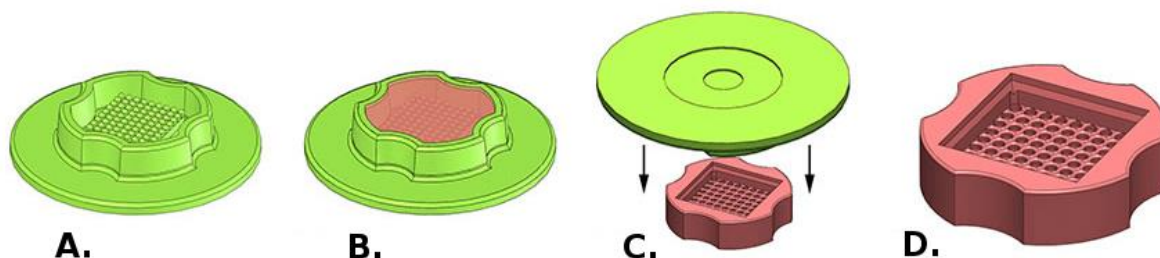
- Mikroforma pro tvorbu 3D Petriho Dish® ve formátu „25-35 – Large spheroids“ (Microtissues, v ČR dostupné od firmy Sigma-Aldrich, kat. č. 35-24)
- Agaróza (Sigma-Aldrich A9539)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, kat.č. 30093-AP0) – 0,9% roztok (w/v)
- 24jamková mikrotitrační destička
- Skleněná lahvička s autoklávaným víčkem (100 ml); centrifugační zkumavka (15 ml); sterilizované kleště a špachtle
- Autokláv; mikrovlnná trouba; termoblok; centrifuga s rotorem na mikrodestičky

Použitá média:

- Médium I - DMEM/F12 red (D6421), 5% HS, 2,5% FBS, 2,5 mM L-glutamin (stejné složení jako kultivační médium; toto médium doporučuje ATCC), Normocin (100 ug/ml)
- Médium II - DMEM/F12 white (D6434), 5% HS, 2,5% FBS, 2,5 mM L-glutamin (stejné složení jako kultivační médium akorát bez fenolové červeně), Normocin (100 ug/ml)
- Médium III – DMEM/F12 white (D6434), 7,5% DCT FBS (dextran-charcoal treated“ FBS; FBS se sníženým obsahem hydrofilních látek, jako jsou hormony; Sigma, kat. č. F6765), 2,5 mM L-glutamin, Normocin (100 ug/ml)

4.3.2 Postup

Předem byl připraven 2% roztok agarózy. Do lahvičky byl navážen 1g agarózového prášku, přidalo se 50 ml sterilního NaCl (0,9% w/v), vše se dobře promíchalo a autoklávovalo (30 min). Na přípravu 3D Petriho Dish® bylo třeba nejprve ztuhlý agarózový roztok rozehtát v mikrovlnné troubě. K vytvoření 24 gelů pro jednu 24jamkovou destičku bylo přeneseno 15 ml agarózy do sterilní mikrozkuhavky (počítalo se cca 400 μ l 2% agarózy na 1 mikrogel). Centrifugační zkuhavka byla dána do termobloku nastaveného na 65°C, aby nedošlo ke ztuhnutí agarózy, a umístěného uvnitř laminárního boxu. Do speciální mikro-formy se přidalo 330 μ l agarózy, přičemž všechny malé bubliny byly odstraněny pomocí pipety. Po ztuhnutí agarózy byly vytvarované 3D Petri Dish® přemístěny z mikro-formy na dno jamky mikrotitrační destičky (Obrázek 5). Všechny 3D Petri Dish® byly pinzetou srovnány do vodorovné polohy v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky. Následně se zbytek roztoku agarózy nechal zchladnout na 50–60°C. Na dno každé jamky mikrotitrační destičky se opatrně přidalo 150 μ l agarózy, čímž došlo k přilepení 3D Petri Dish® ke dnu jamky. Ekvilibrace gelů, tedy nahrazení roztoku NaCl v agaróze kultivačním médiem, se prováděla přidáním 1 ml kultivačního média do každé jamky, destička se umístila do inkubačního boxu na 15 min. Poté se kultivační médium Pasteurovou pipetou odsálo a tento ekvilibrační krok byl ještě jednou zopakován (tedy 1 ml média 2 $\times$ 15 min dle doporučení výrobce).



Obrázek 5: Mikro-forma 3D Petri Dish® pro vytvoření mnohobuněčných sféroidů
(www.microtissues.com, [cit. 19. 5. 2016]).

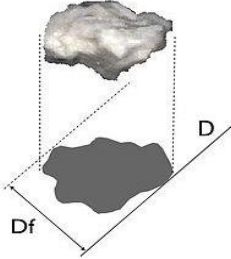
TM3 buňky se pasážovaly podle kapitoly 5.2.2 „Pasážování a kultivace buněk“, počet buněk v buněčné suspenzi byl zjištěn pomocí přístroje Cellometer a na jednu 24jamkovou mikrotitrační destičku se připravil požadovaný objem buněčné suspence o dané koncentraci buněk. Z vnější části 3D Petri Dish® i z výsevné komůrky bylo odsáto kultivační médium a do výsevné komůrky bylo přeneseno 65 μ l buněčné suspence. Buňky se nechaly po dobu 10 min sednout na dno mikrojamek 3D Petri Dish®, potom se do každé jamky mikrotitrační destičky přidal 1 ml kultivačního média a destička se umístila do inkubátoru (37°C/5% CO₂). Výměna média, které obklopovalo 3D Petri Dish®, probíhala vždy po 72, (96), 168, 240 a 336 hod od nasazení buněk.

4.3.3 Hodnocení parametrů charakterizujících vlastnosti sféroidů

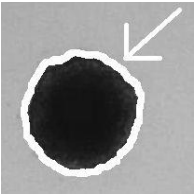
Fotografie sféroidů byly pořizovány po 24, 72, (96), 168, 240 a 336 hod (tj. po dobu cca 14 dní) od založení experimentu (nasazení buněk) pomocí invertovaného mikroskopu Zeiss Axio Z1 Observer (Carl Zeiss, Německo) a systému TissueFAXS (TissueGnostics, Rakousko) ve spojení s CMOS kamerou Baumer HXG40c a s použitím objektivu se zvětšením 2,5×. Jednotlivé fotografie byly vyhodnoceny automaticky makrem vytvořeném v programu ImageJ (NIH, USA; Basu et al., v přípravě) a byly získány hodnoty geometrických parametrů charakterizující daný sféroid a sloužící k popisu jeho velikosti a tvaru (Tabulka x). Přestože je tvar sféroidu prostorový, k charakterizaci sféroidu se využilo dvojrozměrné zobrazení, tedy obrázek analyzovaného sféroidu. K základnímu popisu v rovině byly použity standardní matematické charakteristiky týkající se průmětu sféroidu do roviny kolmé na optickou osu. Vybranými parametry (charakteristikami) jsou plocha, objem, obvod, Feretův průměr, kruhovitost, poměr hlavní a vedlejší osy vhodné elipsy, kulatost a celistvost. Kvůli jednoznačnosti jsou u některých charakteristik uvedeny anglické názvy.

V programu GraphPad 6.0. byl vypočítán medián pro jednotlivé jamky, tedy ze 35 sféroidů. Následně byl z jednotlivých replikátů (duplikát či triplikát) vypočítán aritmetický průměr. Pro parametry s rozměrem byla provedena normalizace na naivní kontrolu (expozice pouze médiu) v daném čase a bylo vypočítáno procento kontroly. Bezrozměrné parametry nebyly normalizovány. Nakonec byly sloučeny dohromady nezávislá opakování (tři až čtyři) a byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka průměru (SEM).

Tabulka 2: Parametry charakterizující sféroid

		Jednotky	Charakteristika ^{A, B}	Vzorec ^{A, B}
Parametry s rozměrem	Feretův průměr (Feret – Feret's diameter)	μm	• Roven nejdelší vzdálenosti bodů, v nichž se dvě paralelní tečny dotýkají obvodu průmětu částice • Slouží k charakterizaci částic nepravidelného tvaru • Směr, kterým jsou vedeny tečny, musí být stejný u všech proměřovaných částic	Převzato z: ^C 
	Objem (Vol – Volume)	μm ³	• Objem kruhu, jehož poloměr je funkcí měřené plochy • Závisí na ploše částice	$Vol = \frac{1}{6} \times \pi \times [Major\ axis]^2 \times [Minor\ axis]$

Pokračování tabulky 2: Parametry charakterizující sféroid

Parametry s rozměrem	Obvod (Perim <i>Perimeter</i>)	– μm	- Délka vnější hranice částice - Součet vzdáleností mezi po sobě následujícími pixely na obrysu částice	Různé metody projekce a výpočtu např. rovnice Cauchy-Crofton 
	Plocha (Area)	μm^2	- Plošný obsah průmětu (tzn. plocha průmětu) částice do roviny mikrofotografie - Součet všech jednotlivých plošných jednotek (pixelů nebo čtverců - ap) na plochu ohraničené částice	$Area = \sum [ap]$
Bezrozměrné parametry	Celistvost (Solid – <i>Solidity</i>)	bezrozměrná	- Určuje poměr celkové plochy, průmětu sféroidu k opsané konvexní ploše - Čím je částice hladší a kulatější, tím víc se hodnota celistvosti blíží 1. - Závisí na tvaru částice	$Solid = \frac{[Area]}{[Convex\ area]}$
	Kulatost (Round <i>Roundness</i>)	– bezrozměrná	- Určuje odchylku od kruhového tvaru - Round = 1 – kruh - Round < 1 – prodloužený tvar - Závisí na ploše průmětu a hlavní ose vhodné elipsy	$Round = \frac{4 \times [Area]}{\pi \times [Major\ Axis]^2}$
	Kruhovitost (Circ <i>Circularity</i>)	– bezrozměrná	- Určuje ideálně kruhovitý objekt - Circ = 1 – ideálně kruhovitá částice - Circ < 1 – částice s prodlouženým tvarem - Určuje odchylku od kruhovitého tvaru v závislosti na obvodu a ploše průmětu	$Circ = \sqrt{\frac{4 \times \pi \times [Area]}{[Perim]^2}}$

Pokračování tabulky 2: Parametry charakterizující sféroid

Bezrozměrné parametry	Poměr stran (AR – Aspect ratio)	bezrozměrná	• Podíl maximální horizontální a vertikální vzdálenosti • Určuje odchylku od kruhovitěho tvaru • AR = 1 – kruh • AR > 1 – elipsa prodloužená ve směru horizontálním • AR < 1 – elipsa prodloužená ve směru vertikálním • Závisí na projekci vhodné elipsy, která nejlépe odpovídá danému tvaru částice (vybraná elipsa má stejnou plochu, orientaci a těžiště jako původní průmět)	$AR = \frac{[Major\ axis]}{[Minor\ axis]}$
-----------------------	---------------------------------	-------------	---	--

^A www.imageJ.nih.gov, (2012). [cit. 16. 4. 2018]; ^B Olson, E. (2011). Journal of GXP Compliance, 15(3), 85.; ^C www.en.wikipedia.org. [cit. 16. 4. 2018]. **Major axis** – velikost hlavní osy vhodné elipsy (fitting ellipse); **Minor axis** – velikost vedlejší osy vhodné elipsy (fitting ellipse).

4.4 Hodnocení životaschopnosti Leydigových TM3 buněk tvořících sféroid pomocí resazurinu

Metoda hodnotící životaschopnost Leydigových TM3 buněk tvořících sféroid je založena na přeměně modrého nefluoreskujícího resazurinu na růžový fluoreskující resorufin, přičemž přeměna závisí na aktivitě mitochondriálních dehydrogenáz v živých buňkách. Množství přeměněného resazurinu tedy odpovídá množství živých buněk ve sféroidech.

4.4.1 Materiál

- 24jamková destička se sféroidy v agarózovém mikrogelu 3D Petri Dish®
- Kultivační médium DMEM/F12 Ham bez FBS a L–glutaminu (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Sterilní mikrocentrifugační zkumavka
- Resazurin (MW=229, Sigma Aldrich, kat.č. R7017, Praha, Česká republika)
- 96jamková černá destička (např. Greiner Bio-one, kat. č. P/N 655098, Kremsmünster, Rakousko)
- Sterilní pipeta, automatická pipeta

- Laminární box
- Mikrodestičkový fluorimetr (Synergy 4, BioTek, Vínoski, USA)

4.4.2 Postup

Resazurin se rozpustil v PSB (pH 7,4) v koncentraci 150 µg/ml (665 µM). Roztok byl přefiltrován (0,2 µm PES filtr) a alikvotován. Alikvoty byly chráněny před světlem a uskladněny při 4°C pro krátkodobé skladování nebo při 20°C pro dlouhodobé (týdny). Kultivační médium DMEM se ohřálo na teplotu 37°C. Na jednu 24jamkovou desku bylo potřeba cca 25 ml média, do kterého se přidalo 0,75 ml roztoku resazurinu, přičemž výsledná koncentrace resazurinu v médiu byla 4,5 µg/ml (20 µM). Před přidáním resazurinu byly sféroidy opláchnuty médiem DMEM. Do každé jamky se přidal 1 ml média DMEM a deska se inkubovala 15 min v inkubátoru (37°C/5% CO₂). Poté se předchozí krok ještě jednou zopakoval. Následně bylo do každé jamky přidáno DMEM s resazurinem (1 ml na jamku) a deska se inkubovala 4 hod v inkubátoru (37°C/5% CO₂). Po celou dobu inkubace ležela deska na třepačce a roztok byl promícháván. Do černé 96jamkové destičky se z každé jamky 24jamkové desky přeneslo 3× 250 µl média (triplikát z každé jamky). Fluorescence přeměněného resazurinu (tzv. resorufin) byla měřena na fluorimetru při vlnových délkách 530/590 nm Ex/Em.

Množství redukovaného resazurinu bylo přímo úměrné hodnotám naměřené fluorescence (FLUs, *fluorescence units*). Od každé hodnoty fluorescence byla odečtena hodnota blanku (jamka s mikrogelmem a s médiem bez buněk). U experimentů hodnotících vliv látek na životaschopnost Leydigových TM3 sféroidů byla provedena normalizace a výsledky jsou vyjádřeny jako procento kontroly (pouze médium). Nakonec byly sloučeny dohromady nezávislá opakování (tři až čtyři) a byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka průměru (SEM).

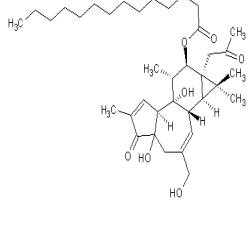
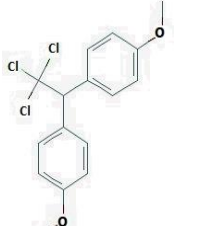
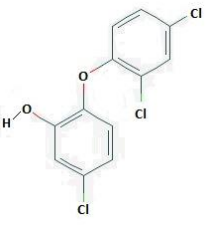
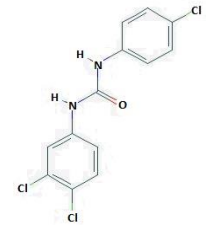
4.5 Testované látky a podmínky expozice

Vybranými chemickými látkami (Tabulka 3) byly modelový promotor karcinogeneze tetradekanoyl forbol acetát (TPA), pesticid metoxychlor (MTX) a látky hojně používané v produktech osobní potřeby (PCPs – Personal Care Products) triklosan (TCS) a triklokarban (TCC). Látky byly rozpuštěny v příslušném rozpouštědle (TPA a TCC v ethanolu, MTX a TCS v acetonitrilu).

Po 96 hod od nasazení buněk pro tvorbu sféroidů, kdy Leydigovy buňky již vytvořily kompaktní sféroid, bylo kultivační médium vyměněno za expoziční médium (1 ml) obsahující testovanou látku nebo rozpouštědlo. Příslušná rozpouštědlová kontrola takovou koncentraci rozpouštědla (ethanol, acetonitril), které odpovídalo koncentraci rozpouštědla v jamkách s testovanými látkami. Výsledná koncentrace rozpouštědla v kultivačním médiu nepřesáhla 0,25 % (v/v). Expoziční médium bylo

měněno po 168 a 240 hod od doby nasazení buněk, tedy po 96 a 168 hod expozice. Výsledná koncentrace MTX, TCS a TCC byla 2; 6; 25 a 100 μ M, TPA byl testován v koncentracích 0,6; 3; 10 a 40 nM.

Tabulka 3: Charakteristika použitých chemických látek

Název látky:	TPA ^A	MTX ^A	TCS ^{A, B}	TCC ^{A, B}
CAS:	16561-29-8	72-43-5	338-34-5	101-20-2
Chemický vzorec struktura	<chem>C36H56O8</chem>  Převzato z: ^C	<chem>C6H15Cl3O</chem>  Převzato z: ^A	<chem>C12H7Cl3O2</chem>  Převzato z: ^A	<chem>C13H9Cl3N2O</chem>  Převzato z: ^A
Vlastnosti	Mr: 616,8 g/mol logKow: 7,36	Mr: 345,6 g/mol logKow: 4,68-5,08	Mr: 289,5 g/mol logKow: 4,76	Mr: 315,6 g/mol logKow: 4,9
Rozpouštědlo	• Ethanol	• Acetonitril	• Acetonitril	• Ethanol
Použití	• Modelový nádorový promoter • K výzkumu nádorové promoce	• Organochlorový pesticid (insekticid) - v současnosti zakázaný v ČR ^D	• Přidáván do zubních past, mýdel, deodorantů (produkty osobní potřeby), čisticích prostředků • Antibakteriální účinek	
Toxicita/ Toxikologické hodnocení	• LD₅₀ = 309 μg/kg u myši (intravenózní aplikace)	• LD₅₀ = 6000 mg/kg u potkana (orální expozice)	• LD₅₀ > 5000 mg/kg u potkana (orální expozice) • LD₅₀ > 9300 mg/kg u králíka (dermální expozice)	• LD₅₀ = 2000 mg/kg u myši (orální expozice) • LD₅₀ = 10000 mg/kg u králíka (dermální expozice)
Reprodukční toxicita u samců	• Promotor karcinogeneze	• Pokles spermatogeneze, atrofie samčích pohlavních orgánů u myši a potkanů (<i>in vivo</i> studie) ^E • Pokles váhy u varlat, semenných váčků u potkanů (<i>in vivo</i> studie, orální expozice) ^F	• Nebyl prokázán (anti)androgenní účinek (<i>in vivo</i> Hershbergerův test na potkanech) ^G • Interaguje s androgenním i estrogenním receptorem (<i>in vitro</i> studie)	• Zvětšení přídatných pohlavních žláz u kastrovaných potkanů (<i>in vivo</i> studie, orální expozice) ^H • Zesiluje účinek testosteronu u nádorových buněk prostaty (<i>in vitro</i> studie) ^H

Pokračování tabulky 3: Charakteristika použitých chemických látek

Osud v životním prostředí	Informace o biodegradaci v půdě nebo vodě nejsou dostupné	- Nevypařuje se - BCF: 2500-8700 $t_{1/2}$: ve vodě < 25 dní, v půdě > 100 dní (aerobní), < 30 dní (anaerobní) ^I - Hory a lesní půdy v ČR: 0,17-0,79 ng/g ^D - Pitná voda v ČR: 2,5 ng/l (limit 100 ng/l) (2017)	- Nevypařuje se - V půdě je imobilní - BCF: 2,7—90 (vodní organismy) $t_{1/2}$: ve vodě 41 min^J, v půdě (aerobní podmínky) 18 dní ^J - Nejvyšší obsah v ČR – 100-340 µg/kg sedimentu – řeky Olše, Bílina, Lužická Nisa, Svatka ^K 12-4160 ng/l (odpadní vody) ^L 42-874 ng/l (povrchové vody) ^L	- Nevypařuje se - V půdě imobilní - BCF: 80 (u kapra) $t_{1/2}$: ve vodě 60 dní, v půdě 120 dní, v sedimentu 540 dní ^M 0,023-0,045 µg/l v odpadních vodách (2010 v USA)
----------------------------------	---	---	--	---

^A PubChem Compound, www.ncbi.nlm.nih.gov [cit. 27.3.2018].; ^B Halden et al. (2017). Environ. Health Perspect., 125(6).; ^C www.chemister.ru [cit. 16.4.2018].; ^D Holoubek a kol. (2006). Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí. Dostupné z: www.phytosanitary.org/old/projekty/2005/VVF_13_2005.pdf; ^E Aoyama, H. and Chapin, R.E. (2014). Vitam. Horm., 94, 193.; ^F Wilam, W. and Edgcomb, J.H. (1962). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 138(1), 126.; ^G Pernocini et al. (2018). Reprod. Toxicol., 75, 65.; ^H Duleba et al. (2011). Reprod. Sci., 8(2), 119.; ^I Toxicological profile for methoxychlor. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2002.; ^J Dhillon et al. (2015). Int. J. Environ. Res. Public Health, 12(5), 5657.; ^K Zpráva o stavu vodního hospodářství České republiky v roce 2014. MZe ČR., 2014; ^L Draft federal environmental quality guidelines. Environment and Climate Change Canada, 2017.; ^M Halden, R.U. Paull D.H. (2005). Environ. Sci. Technol., 39(6), 1420. **BCF** – biokoncentrační faktor; **LD₅₀** – letální dávka pro 50 % testovaných organismů; **logK_{ow}** – logaritmus rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda; **MTX** – methoxychlor; **Mr** – relativní molekulová hmotnost; **t_{1/2}** – poločas rozpadu chemické látky; **TPA** – 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetát; **TCC** – triklokarban; **TCS** – triklosan.

4.6. Statistické vyhodnocení dat

Vyhodnocená data byla statisticky zpracována v programu SigmaPlot 12.3. K určení dat s normálním rozložením byl použit test normality (Shapiro-Wilkův test), shodnost rozptylů byla potvrzena Levenovým testem (Equal of variance test). Data s normálním rozložením a shodnými rozptyly byla nakonec vyhodnocena testem one-way ANOVA a poté Dunnetovým nebo Tukeyho post hoc testem. Neparametricky rozložená data byla statisticky hodnocena Kruskal-Wallisovým testem s následným Dunnovým post hoc testem. Pro posouzení rozdílnosti dvou variant se použil neparametrický Mann-Whitneyův rank sum test. Hladina významnosti byla zvolena $\alpha = 0,05$ (*, $P \leq$

0,05; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$), tedy hodnota P určuje, zda se významně odlišuje použitá koncentrace látky od kontrolní skupiny.

5 Výsledky

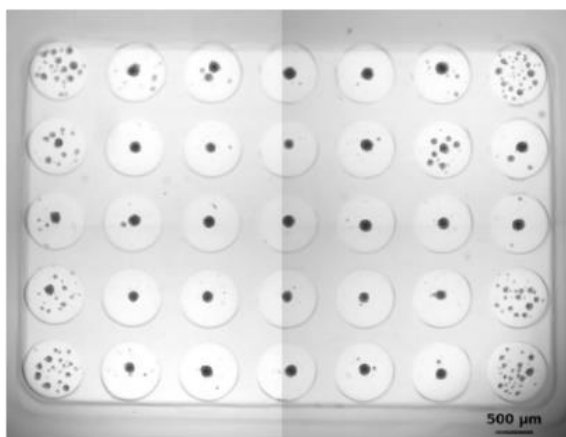
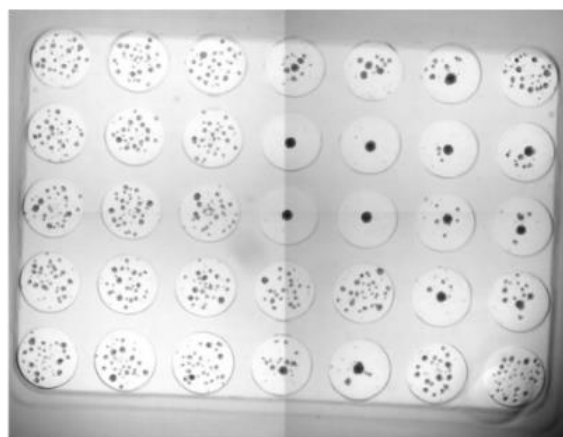
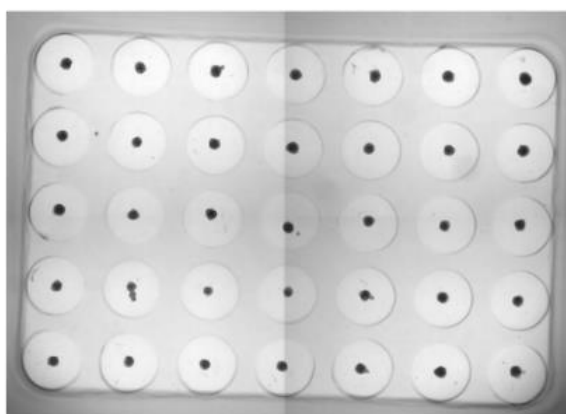
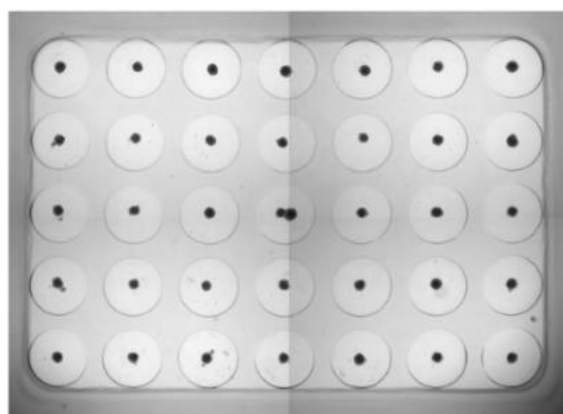
5.1 Optimalizace podmínek pro tvorbu mnohobuněčných sféroidů a hodnocení jejich životaschopnosti

5.1.1 Ekvilibrace mikrogelů před nasazením buněk

Při přípravě agarózových mikrogelů vyrobených technikou 3D Petri Dish® je výrobcem před nasazením buněk doporučována ekvilibrace mikrogelů v kultivačním médiu po dobu 2×15 min. Tento krok slouží k dosažení rovnováhy koncentrací chemických látek obsažených v kultivačním médiu mezi agarózovým gelem a přidaným kultivačním médiem, v tomto případě konkrétně k nahrazení roztoku NaCl v agaróze kultivačním médiem. V předchozích experimentech bylo zjištěno, že difuzní výměna rozpuštěných látek mezi médiem a agarózovým gelem probíhá alespoň pro některé látky pomaleji a k dosažení rovnováhy mezi oběma fázemi dochází až po několika hodinách. Pro tyto látky tedy nestačí výrobcem doporučená doba ekvilibrace 2×15 min k úplnému dosažení rovnovážného stavu rozpuštěných látek mezi kapalinným médiem a mikrogelem. Např. pro neutrální červen by měla ekvilibrace optimálně probíhat min. po dobu 4 hod (Musilová, 2017). Cílem tohoto optimalizačního kroku mělo být posouzení vlivu doby a podmínek ekvilibrace mikrogelů v kultivačním médiu na následnou tvorbu sféroidů. Jelikož samotná tvorba sféroidů a testování účinků látek na jejich velikost, tvar a životaschopnost trvá cca. 14 dní, z časových a praktických důvodů byla zvolena delší doba ekvilibrace 72 hod (tedy přes víkend). Podle kapitoly 5.3. „Vytváření mnohobuněčných sféroidů metodou 3D Petri Dish®,“ byly vytvořeny mikrogely ve dvou 24jamkových deskách. Do každé jamky bylo přidáno kompletní kultivační médium (1 ml), následně byly desky s mikrogely obaleny parafilmem a uloženy do lednice (4°C) z důvodu snížení pravděpodobnosti vzniku kontaminace, vypařování kultivačního média a tepelné degradace některých jeho složek. Ekvilibrace gelů v kultivačním médiu probíhala 72 hod. Před nasazením Leydigových buněk do mikrogelů byla jedna z ekvilibrovaných 24jamkových desek (Varianta 1) vyjmuta z lednice a vložena do inkubátoru (37°C/5% CO₂) na 60 min. Druhá 24jamková deska (Varianta 2) byla ponechána v lednici až do chvíle nasazení Leydigových TM3 buněk do mikrogelů. K tomu byly ještě vytvořeny mikrogely ve třetí 24jamkové desce, do každé jamky bylo opět přidáno kultivační médium, deska byla obalena parafilmem a uložena do lednice (4°C) na

dobu 15 min (Varianta 3). Mikrogely ve čtvrté desce byly ekvilibrovány 2×15 min při pokojové teplotě (Varianta 4). Do všech čtyř desek pak byly nasazeny Leydigovy buňky v různých koncentracích.

V případě Varianty 1 nedošlo během 24 hod v některých mikrojamkách (zejména na okrajích mikrogelu) ekvilibrovaných po dobu tří dnů v lednici k vytvoření kompaktního sféroidu, ačkoli byla deska s mikrogely před nasazením buněk ponechána 1 hod v inkubátoru ($37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$; Obrázek 6) pro koncentraci nasazených buněk 500 b/sf; podobné výsledky byly pozorovány i pro koncentrace 8000, 4000, 1000 a 250 b/sf. Vliv nízké teploty mikrogelů na tvorbu sféroidů byl potvrzen i ve Variantě 2, která nebyla vůbec temperovaná před nasazením buněk. V této variantě se ve většině mikrojamek mikrogelů nevytvořily kompaktní sféroidy (Obrázek 6) ve všech nasazených buněčných koncentracích. I v této variantě se ojedinělé sféroidy vytvořily v mikrojamkách uprostřed mikrogelů. Ke zvyšování teploty v mikrogelu při temperování v inkubátoru tedy pravděpodobně dochází od středu mikrogelu ke kraji. V případě Varianty 3 (15 min ekvilibrace v lednici) a Varianty 4 (ekvilibrace 2×15 min při pokojové teplotě) se během 24 hod vytvořily kompaktní sféroidy. Ačkoli byla ve Variantě 3 též deska s mikrogely uložena do lednice, tak se mikrogely nestihly příliš ochladit a neovlivnilo to tvorbu sféroidů ve všech koncentracích nasazovaných buněk. Doba nutná k ohřátí mikrogelů na teplotu 37°C byla zjištěna měřením teploty mikrogelů v jamce 24jamkové desky ekvilibrované po dobu 24 hod v lednici a následně přenesené do inkubátoru ($37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$). Během 1 hod se teplota mikrogelů zvýšila na 28°C , což se ale ukázalo jako nedostatečné (Varianta 1). K dosažení požadované teploty 37°C v mikrogelu byla potřebná inkubace desky po dobu min. 4 hod, čímž by se příprava 24jamkové desky s mikrogely a sféroidy stala z časového a praktického hlediska velmi náročnou. Na základě těchto kroků byl pro další experimenty zvolen původní postup ekvilibrace mikrogelů v kultivačním médiu dle doporučení výrobce (2×15 min). Pokud by se používalo kultivační médium, jehož složky jsou finančně náročné, bylo by možné na základě těchto výsledků vynechat krok výměny kultivačního média po prvních 15 min ekvilibrace, tedy ekvilibrace by probíhala nepřetržitě 30 min v 1 ml kultivačního média.

Varianta 1**Varianta 2****Varianta 3****Varianta 4****Obrázek 6: Vliv podmínek ekvilibrace mikrogelů vyrobených technikou 3D Petri Dish® na tvorbu sféroidů.**

Varianta 1: 24j deska s mikrogely ekvilibrovanými 3 dny při teplotě 4°C s následnou inkubací při 37°C po dobu 1 hod před nasazením Leydigových TM3 buněk; Varianta 2: 24j deska s mikrogely ekvilibrovanými 3 dny při teplotě 4°C s okamžitým nasazením Leydigových TM3 buněk; Varianta 3: 24j deska s mikrogely ekvilibrovanými 15 min při teplotě 4°C s okamžitým nasazením Leydigových TM3 buněk; Varianta 4: 24j deska s mikrogely ekvilibrovanými 2×15 min při pokojové teplotě s okamžitým nasazením Leydigových TM3 buněk. Jednotlivé fotografie zobrazují reprezentativní agarózový mikrogel s 35 mikrojamkami. Koncentrace nasazených buněk: 500 b/sf.

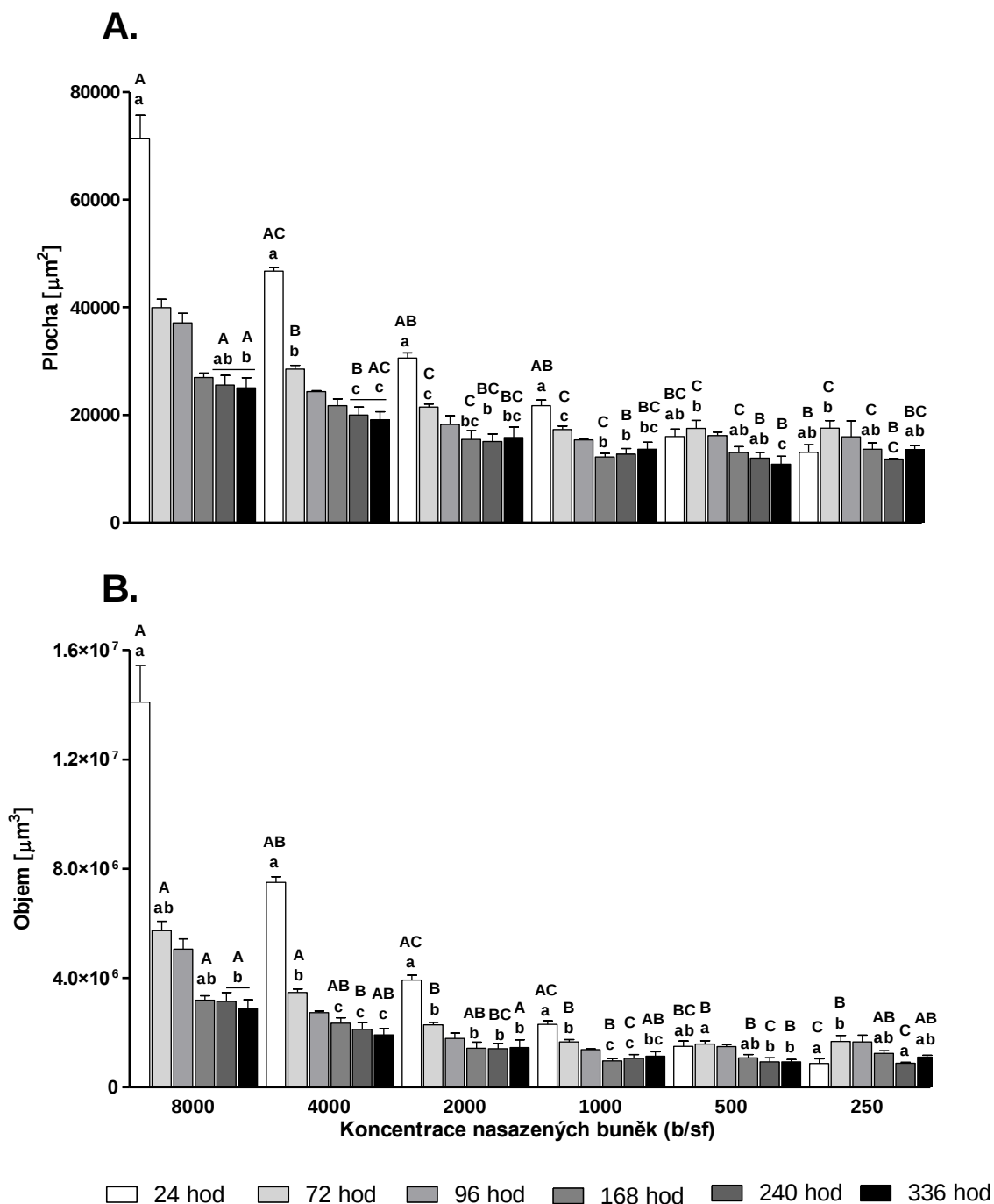
5.1.2 Změna velikosti a tvaru sféroidů z Leydigových TM3 buněk v závislosti na počáteční koncentraci nasazených buněk a na čase

Cílem tohoto optimalizačního kroku bylo zjistit vliv počtu nasazených buněk (250, 500, 1000, 2000, 4000 nebo 8000 b/sf) a doby kultivace (až 14 dní) na velikost, tvar a životaschopnost sféroidů z Leydigových TM3 buněk a najít vhodnou počáteční koncentraci buněk a dobu kultivace, která umožní vytvoření kompaktního sféroidu, jehož velikost ani tvar se již podstatně nemění v čase. Velikost sféroidů byla charakterizována pomocí parametrů plocha, objem, obvod a Feretův průměr a tvar sféroidů byl charakterizován pomocí parametrů kruhovitost, kulatost, celistvost a poměr stran.

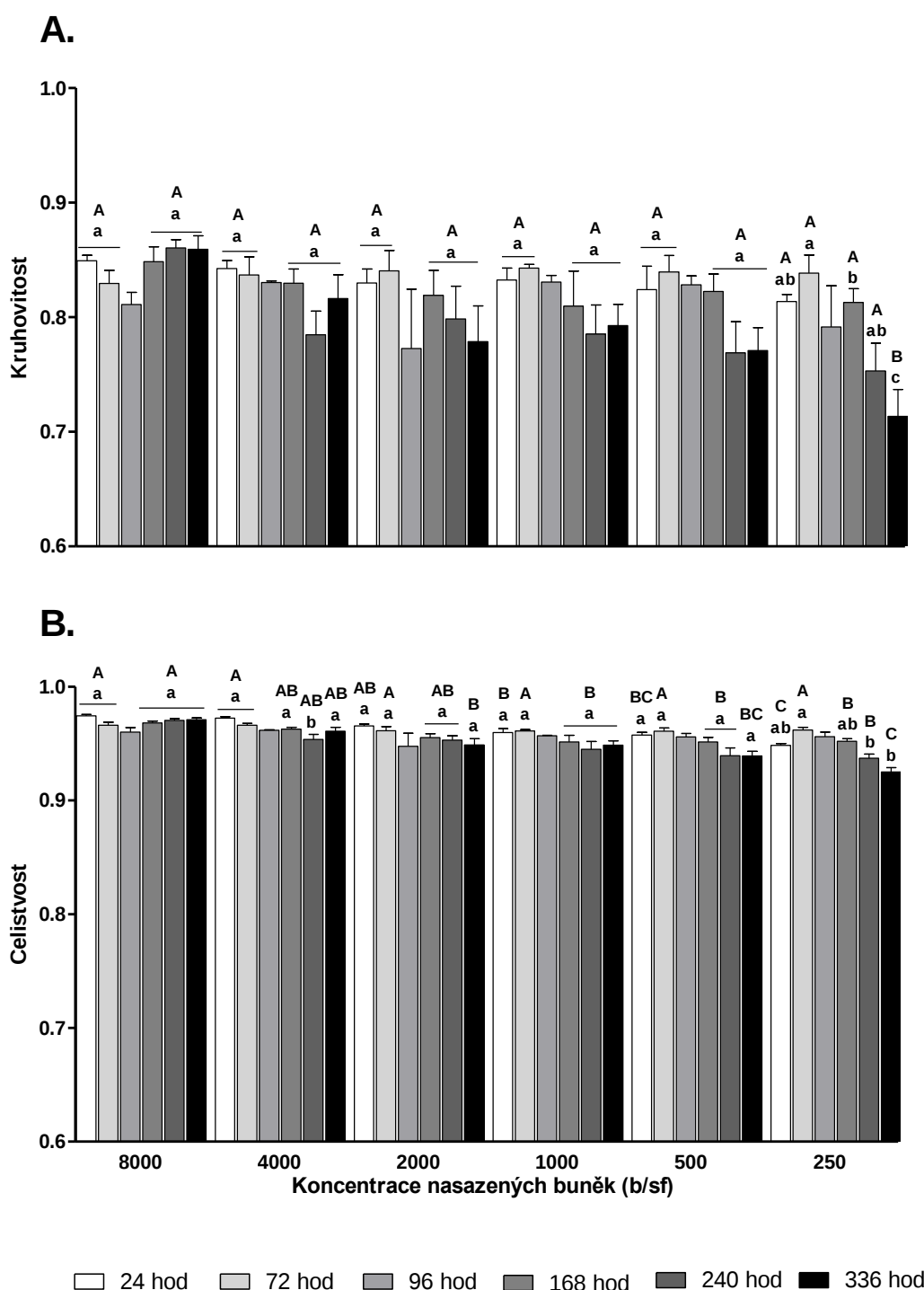
Po 24 hod od nasazení buněk se vytvořily kompaktní sféroidy Leydigových TM3 buněk (Obrázek 9 A.), jejichž velikost se snižovala se snižujícím se počtem nasazených buněk, např. sféroidy s počáteční koncentrací 250 b/sf měly plochu menší o zhruba 60 % v porovnání se sféroidy 8000 b/sf, objem o 70–80 % (Obrázek 7 a Příloha 1 Obrázek 36 A.–B.). V nejvyšších koncentracích nasazených buněk (8000 b/sf) dochází k nejprudšímu poklesu velikosti mezi 24 a 72 hod kultivace o 30–40 % a po celou další dobu kultivace se velikost sféroidů nezvyšuje. Ani v případě nižších koncentrací nasazených buněk nedochází k růstu sféroidů (kromě mírného nárůstu objemu mezi 24 a 72 hod v případě počtu nasazených buněk 250 b/sf), spíše k redukci jejich velikosti, míra redukce se snižuje se snižujícím se počtem nasazených buněk. Během kultivace dochází v čase k mírným změnám tvaru sféroidů. Nejvýraznější změna je vidět u nejnižších počtů nasazených buněk (250 nebo 500 b/sf), kdy se zvyšujícím časem se tvar odchyluje od kruhu či kulatého útvaru a prodlužuje se ve vertikálním směru (Obrázek 8 A.–B.; Příloha 1 Obrázek 37 A.–B.).

Reprezentativní fotografie (Obrázek 9 A.) názorně dokládají počáteční závislost velikosti sféroidů na počtu nasazených buněk, změnu jejich velikosti v čase a mírnou fluktuaci tvaru sféroidů v čase zejména u nižších počtů nasazených buněk.

Na konci kultivace (po cca. 14 dnech) byly buňky ve sféroidech životaschopné u všech variant počtů nasazených buněk (Obrázek 9 B.). Životaschopnost sféroidů se zvyšovala se zvyšujícím počtem nasazených buněk

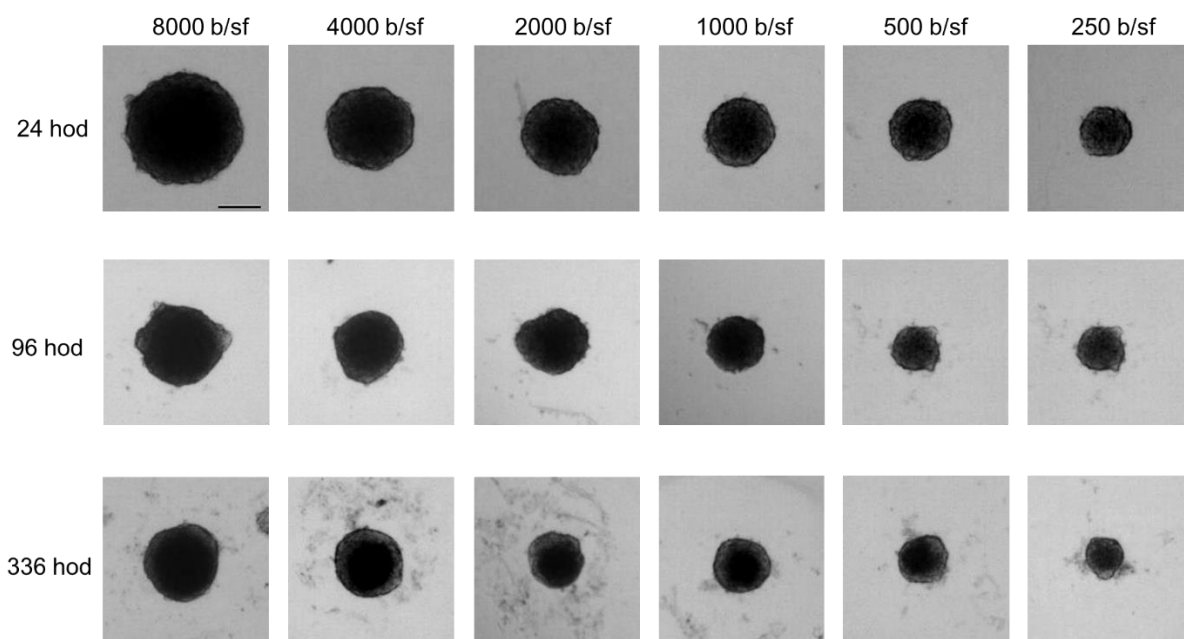


Obrázek 7: Vliv počtu nasazených Leydigových TM3 buněk a doby kultivace na velikost sféroidů. Velikost sféroidů je charakterizována plochou (A.) a objemem (B.). Koncentrace nasazených buněk: 8000–250 b/sf, fotodokumentace probíhala 24, 72, 96, 168, 240 a 336 hod od nasazení buněk. Data jsou zobrazena jako průměr nezávislých experimentů $\pm$ SEM ($n = 4$; $n = 2$ pro čas 96 hod). Statisticky významná odlišnost ($P < 0,05$; one-way ANOVA s Tukeyovým post hoc testem nebo Kruskal-Wallis test s Dunnovým post hoc testem) mezi různými koncentracemi nasazených buněk v daném čase je vyjádřena odlišným velkým písmenem a mezi různými kultivačními časy pro danou koncentraci nasazených buněk odlišným malým písmenem. Čas 96 hod nebyl do statistického hodnocení zahrnut, jelikož byl nezávisle opakován pouze dvakrát.

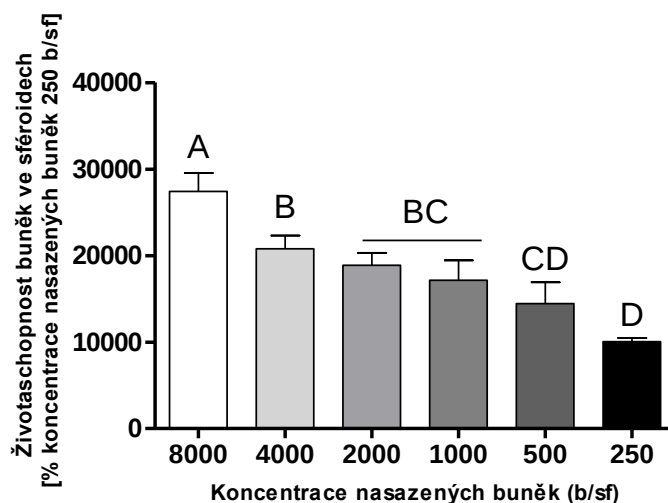


Obrázek 8: Vliv počtu nasazených Leydigových TM3 buněk a doby kultivace na tvar sféroidů. Tvar sféroidů je charakterizován kruhovitostí (A.) a celistvostí (B.). Koncentrace nasazených buněk: 8000–250 b/sf, fotodokumentace probíhala 24, 72, 96, 168, 240 a 336 hod od nasazení buněk. Data jsou zobrazena jako průměr nezávislých experimentů $\pm$ SEM ($n = 4$; $n = 2$ pro čas 96 hod). Statisticky významná odlišnost ($P < 0,05$; one-way ANOVA s Tukeyovým post hoc testem nebo Kruskal-Wallis test s Dunnovým post hoc testem) mezi různými koncentracemi nasazených buněk v daném čase je vyjádřena odlišným velkým písmenem a mezi různými kultivačními časy pro danou koncentraci nasazených buněk odlišným malým písmenem. Čas 96 hod nebyl do statistického hodnocení zahrnut, jelikož byl nezávisle opakován pouze dvakrát.

A.



B.

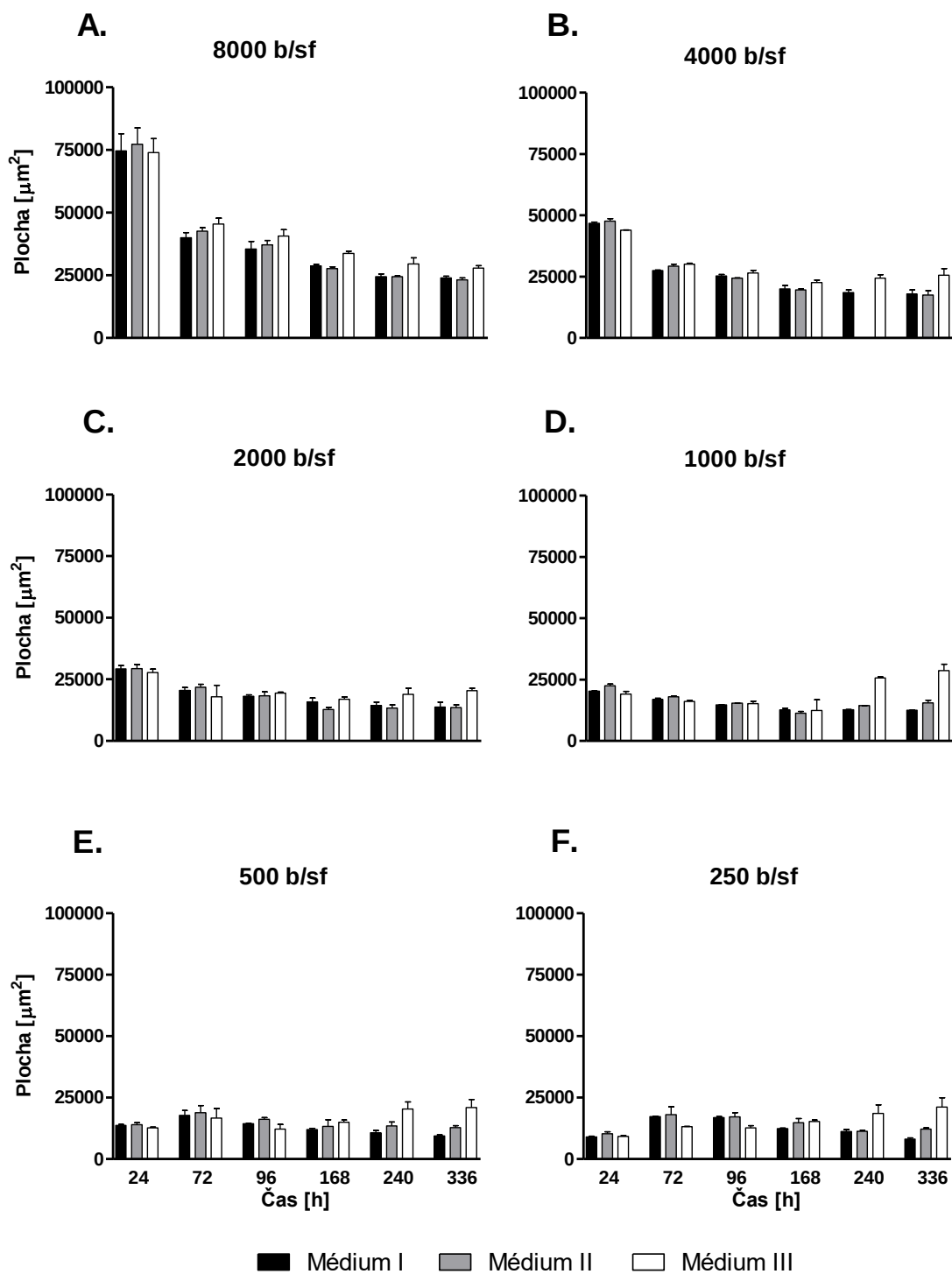


Obrázek 9: Vliv počtu nasazených buněk a doby kultivace na velikost, tvar a životaschopnost sféroidů Leydigových TM3 buněk. (A.) Reprezentativní fotografie sféroidů Leydigových TM3 buněk v době 24, 96 a 336 hod od nasazení. Koncentrace nasazených buněk: 8000–250 b/sf. Měřítka: 100 μ m. **(B.)** Vliv počtu nasazených Leydigových TM3 buněk na životaschopnost sféroidů Leydigových TM3 buněk. Životaschopnost byla měřena po 336hod kultivaci s využitím resazurinu jako indikátoru metabolicky aktivních buněk. Data jsou vyjádřena jako procento koncentrace 250 b/sf a prezentována jako průměr nezávislých experimentů $\pm$ SEM ($n = 4$). Statisticky významně se odlišují koncentrace buněk s odlišným písmenem ($P < 0,05$; one-way ANOVA s Tukeyovým post hoc testem).

5.1.3 Vliv složení kultivačního média na charakteristiky sféroidů během kultivace

Třetím krokem optimalizace bylo posouzení vlivu složení kultivačního média na tvorbu, růst a životaschopnost buněčných sféroidů Leydigových TM3 buněk. Kultivace sféroidů probíhala ve třech kultivačních médiích odlišného složení. První médium (Médium I), které ATCC doporučuje pro kultivaci Leydigových TM3 buněk obsahuje fenolovou červeň, která slouží jako indikátor pH, ovšem je zde podezření na estrogení účinek v koncentraci běžně se nacházející v kultivačním médiu (15–45 μM ; Berthois et al., 1986) a na možné ovlivnění citlivosti buněk na látky s endokrinní aktivitou (Węsierska-Gądek et al., 2007). Druhé médium (Médium II) mělo tedy stejné složení jako první médium, ovšem fenolovou červeň neobsahovalo. V Médii II byly provedeny všechny předchozí experimenty (Kap. 6.1.2). Třetí médium (Médium III) též neobsahovalo fenolovou červeň a zároveň místo koňského a fetálního bovinního séra obsahovalo sérum se sníženým obsahem hormonů, aby mohl být sledován vliv hormonů na tvorbu sféroidů Leydigových TM3 buněk.

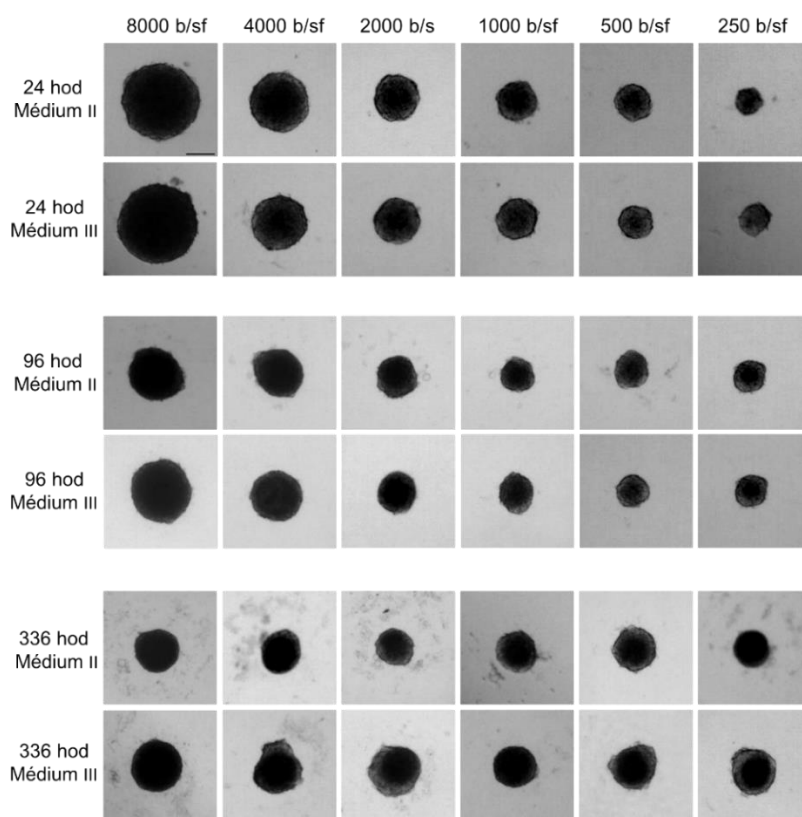
U všech médií se během 24 hod vytvořily kompaktní sféroidy s podobnou velikostí a tvarem. V případě vyšších koncentrací nasazených buněk došlo během prvních 72 hod kultivace k poklesu velikosti sféroidů (Obrázek 10, 12 A.–F.; Příloha 2 Obrázek 38, 39 A.–F.), což je dokumentováno i na fotografiích (Obrázek 11 A.). Mezi Médii I a II nebyl rozdíl, v Médii III byl pokles velikosti pozvolnější. Velikost sféroidů v Médii I a II dále v čase nevzrůstá. Naproti tomu v Médii III (snížený obsah hormonů) dochází v nižších koncentracích buněk (1000, 500 a 250 b/sf) k nárůstu velikosti sféroidů, zejména v pozdější době kultivace. Parametry charakterizující tvar sféroidu fluktuují v čase, avšak nevykazují žádný výrazný trend (Obrázek 13, 14 A.–F.; Příloha 2 Obrázek 40, 41 A.–F.), takže se dá říci, že se tvar v čase ve všech třech médiích nemění, což je doloženo i na fotografiích (Obrázek 11 A.). Na konci kultivace byly sféroidy ve všech médiích tvořeny životaschopnými buňkami, nebyl zaznamenán rozdíl mezi jednotlivými médii. Životaschopnost sféroidů se zvyšovala se zvyšujícím se počtem nasazených buněk (Obrázek 11 B.).



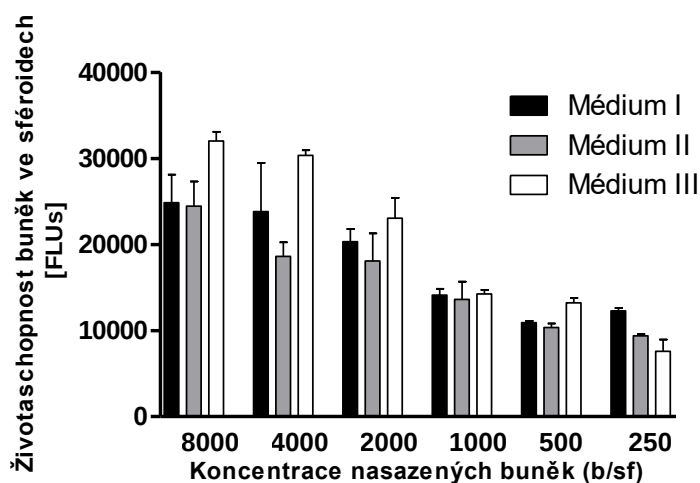
Obrázek 10: Vliv složení kultivačního média na velikost (plochu) sféroidů Leydigových TM3 buněk. Data jsou vyjádřena jako medián průměr $\pm$ SEM ($n = 2$) nezávislých experimentů. Koncentrace nasazených buněk: 8000, 4000, 2000, 1000, 500 a 250 b/sf. Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)).

Médium III: médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)).

A.

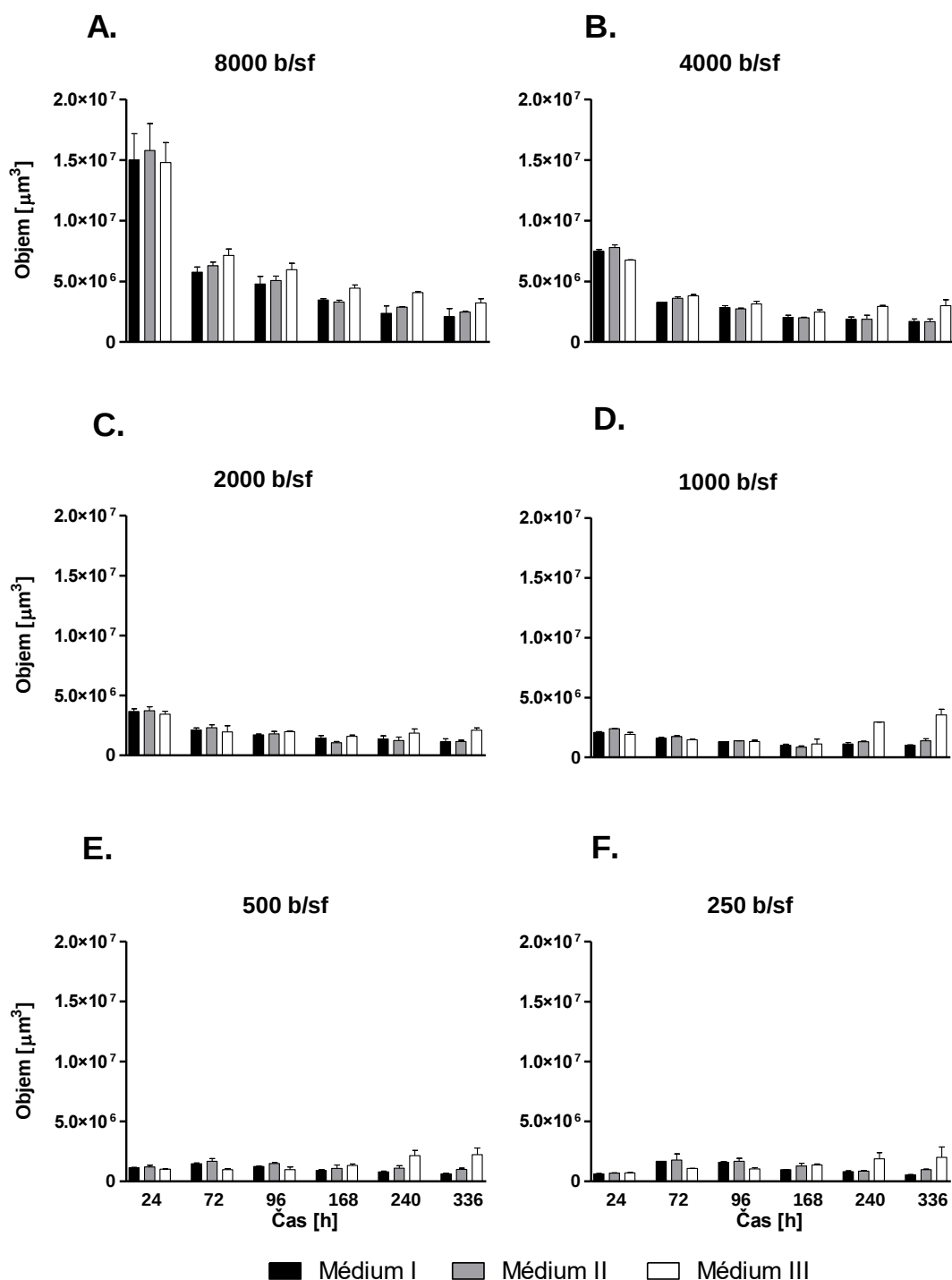


B.

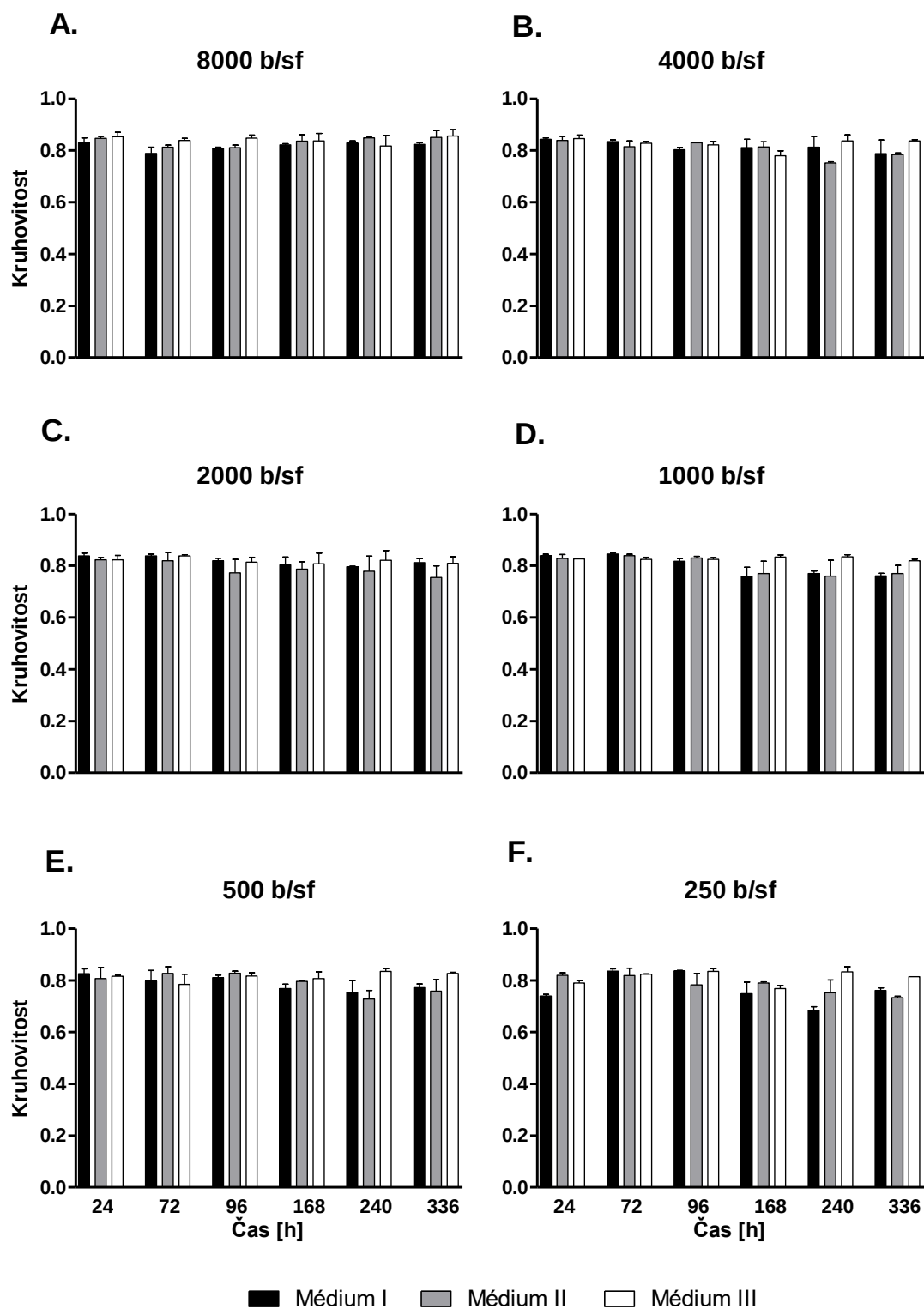


Obrázek 11: Vliv složení kultivačního média na velikost, tvar a životaschopnost sféroidů Leydigových TM3 buňek. (A.) Reprezentativní fotografie sféroidů Leydigových TM3 buněk kultivovaných v Médiumu II a III a fotografovány po 24, 96 a 336 hod od nasazení. Koncentrace nasazených buněk: 8000–250 b/sf. Měřítka: 100 µm. (B.) Vliv složení média na životaschopnost sféroidů Leydigových TM3 buněk. Životaschopnost byla měřena po 336 hod s využitím resazurinu jako indikátoru metabolicky aktivních buněk. Data jsou prezentována jako průměr nezávislých experimentů ± SEM (n = 2). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12

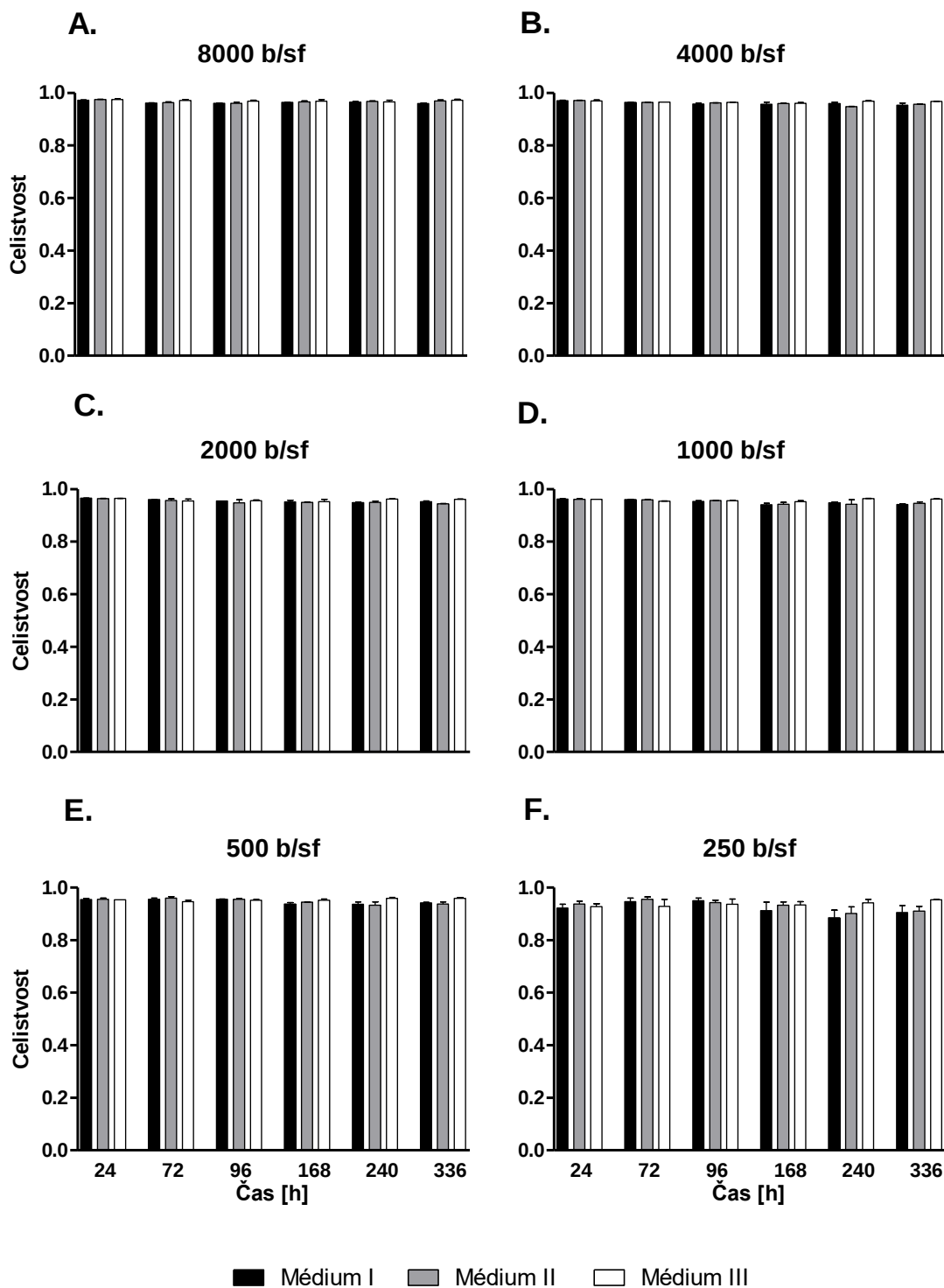
white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)). Médium III: médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)).



Obrázek 12: Vliv složení kultivačního média na velikost (objem) sféroidů Leydigových TM3 buněk. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM (n = 2) nezávislých experimentů. Koncentrace nasazených buněk: 8000, 4000, 2000, 1000, 500 a 250 b/sf. Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)). Médium III: médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)).



Obrázek 13: Vliv složení kultivačního média na tvar (kruhovitost) sféroidů Leydigových TM3 buněk. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM ($n = 2$) nezávislých experimentů. Koncentrace nasazených buněk: 8000, 4000, 2000, 1000, 500 a 250 b/sf. Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium III: médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)).



Obrázek 14: Vliv složení kultivačního média na tvar (celistvost) sféroidů Leydigových TM3 buněk. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM ($n = 2$) nezávislých experimentů. Koncentrace nasazených buněk: 8000, 4000, 2000, 1000, 500 a 250 b/sf. Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium III: médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)).

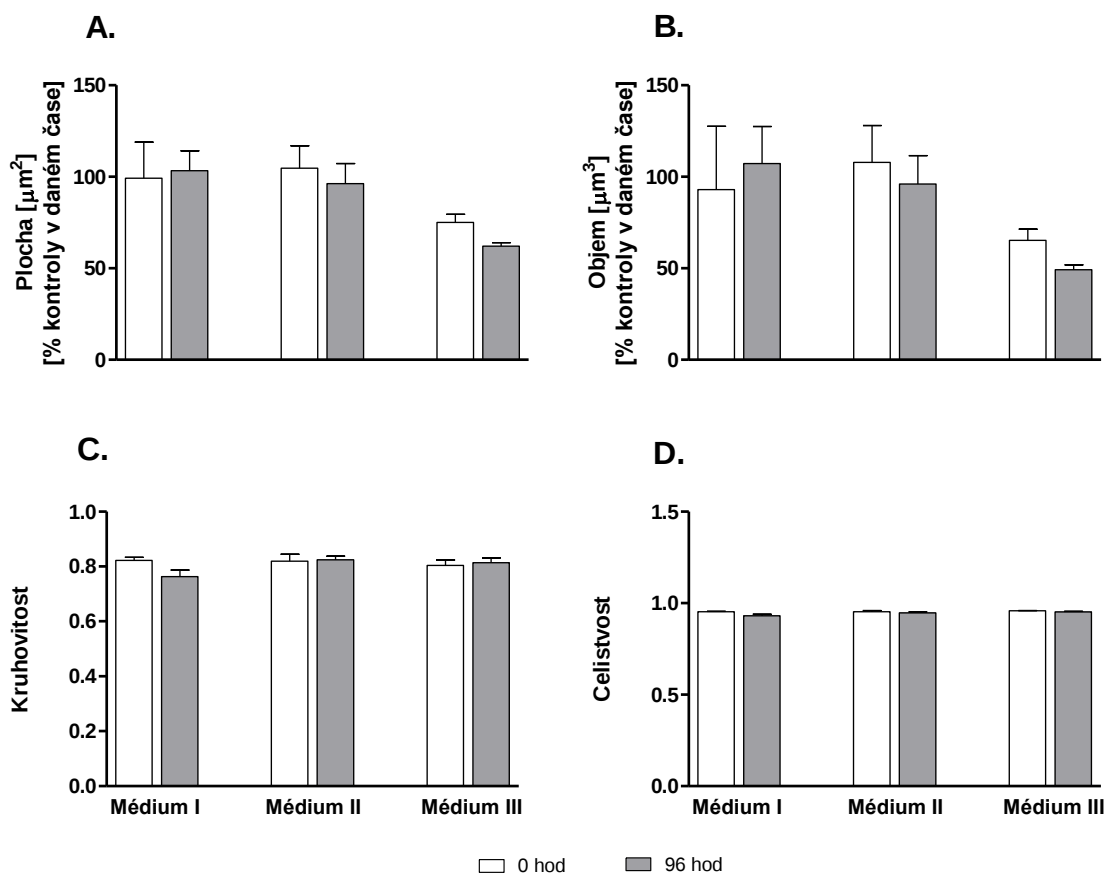
5.1.4 Optimalizace hodnocení vlivu látek na životaschopnosti sféroidů

Posledním čtvrtým krokem byla optimalizace metody hodnocení vlivu látek na životaschopnost Leydigových TM3 buněk tvořících sféroid pomocí indikátoru metabolicky aktivních buněk resazurinu. Buňky byly nasazeny v koncentraci 1000 b/sf ve třech různých médiích (Médium I-III) a jako modelový toxikant byl zvolen azid sodný (NaN_3) v koncentraci 150 mM (Váňová, 2016). Kompaktní sféroidy byly exponovány azidu sodnému po 240 hod od nasazení buněk po dobu 96 hod, následně byla měřena životaschopnost exponovaných i neexponovaných sféroidů.

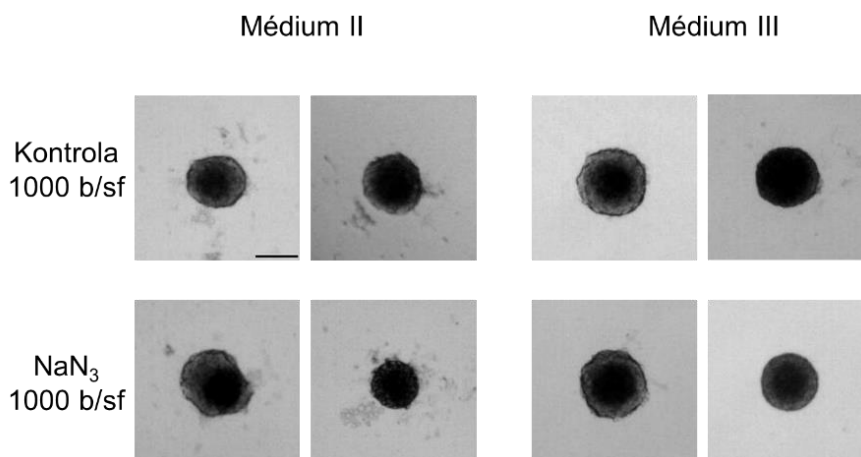
Velikost ani tvar sféroidů exponovaných po dobu 96 hod azidem sodným v koncentraci 150 mM se v porovnání s týmiž sféroidy před expozicí ani v jednom médiu výrazně nemění (Obrázek 15 A.–D.).

Totéž potvrzují i fotografie (Obrázek 15 E.).

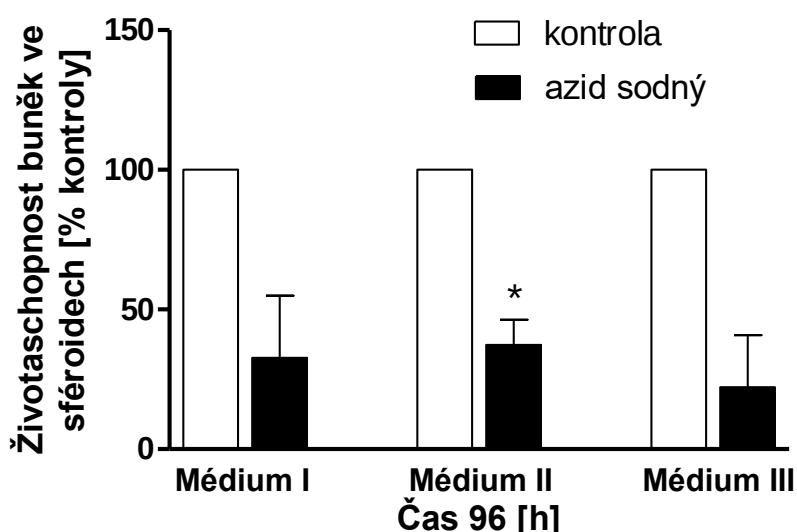
Negativní vliv azidu sodného na sféroidy Leydigových TM3 buněk byl zaznamenán až měřením životaschopnosti Leydigových buněk ve sféroidu, která klesla pod 50 % kontrolní skupiny u všech třech kultivačních médií (Obrázek 15 F.). Výsledky tedy potvrdily využitelnost metody stanovující metabolicky aktivní buňky ve zvolených podmínkách pro stanovení vlivu látek na životaschopnost buněk sféroidů Leydigových TM3 buněk.



E.



F.



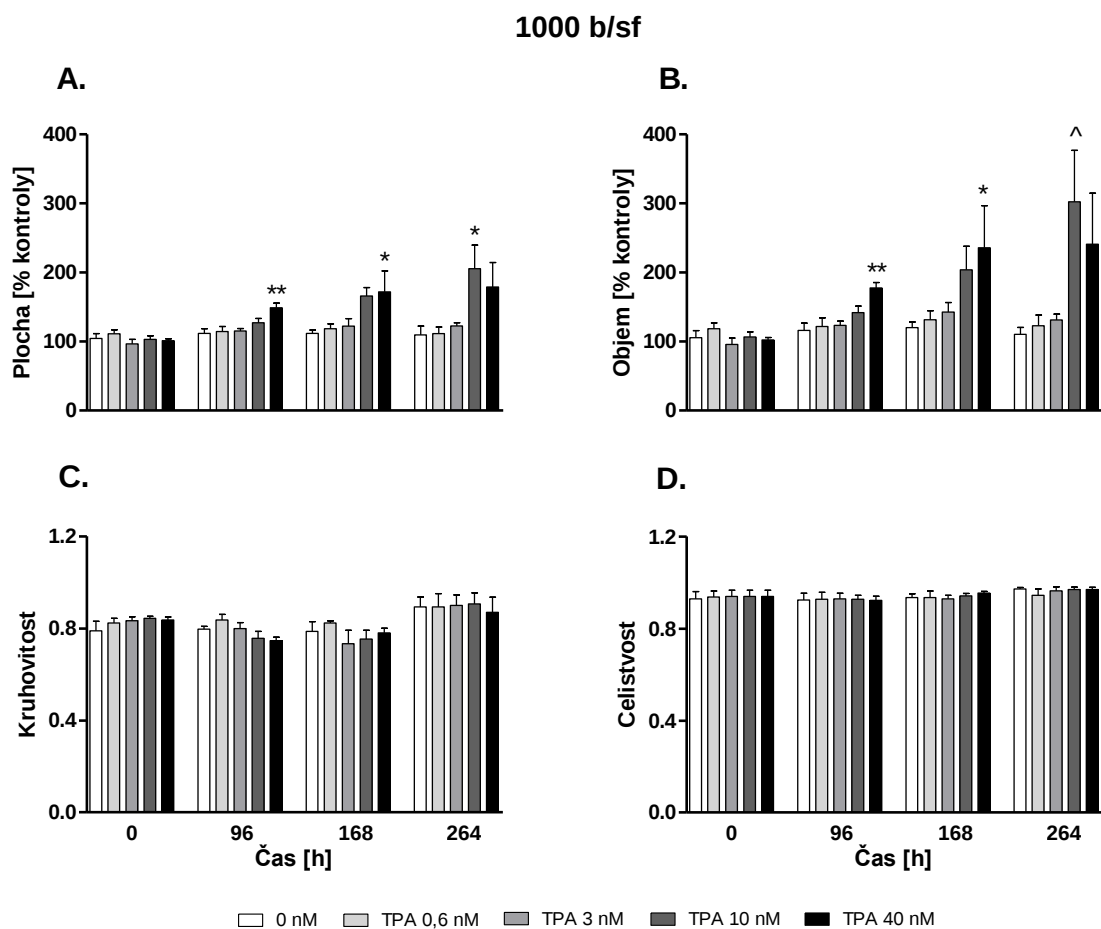
Obrázek 15: Vliv azidu sodného na velikost, tvar a životaschopnost sféroidů tvořených Leydigovými TM3 buňkami a závislost jeho účinku na složení média. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf; kultivace sféroidů před expozicí: 240 hod; expoziční čas: 96 hod; koncentrace azidu sodného: 150 mM. **(A.–D.)** Data jsou vyjádřena jako průměr z nezávislých experimentů $\pm$ SEM ($n = 2$; $n = 4$ pro Médium II). Pro plochu a objem byla data normalizována a prezentována jako % kontroly (neexponované sféroidy) v daném čase. Data pro kruhovitost a celistvost normalizována nebyla. **(E.)** Reprezentativní fotografie sféroidů před expozicí (0 hod) a po expozici (96 hod). Měřítka: 100 μ m. **(F.)** Vliv azidu sodného na životaschopnost buněk sféroidů ve třech kultivačních/expozičních médiích. Data jsou prezentována jako procento kontroly (neexponované sféroidy). Pro Médium II byla odlišnost od kontroly potvrzena statistickou analýzou ($n = 4$; $p < 0,05$, Mann-Whitney Rank Sum Test). Data pro Média I a III statisticky vyhodnocena nebyla kvůli nízkému počtu nezávislého opakování experimentů ($n = 2$). Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium III: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)).

5.2 Hodnocení testikulární toxicity vybraných látek v 3D modelu Leydigových buněk

Testikulární toxicita vybraných chemických látek byla hodnocena dle jejich vlivu na velikost a tvar sféroidů Leydigových buněk a na jejich životaschopnost po dobu 264hod expozice. Na základě optimalizace podmínek kultivace sféroidů byly nasazeny dvě koncentrace buněk – 1000 a 4000 b/sf. Po 96hod kultivaci byly sféroidy vzniklé z 1000 b/sf menší než sféroidy vzniklé ze 4000 b/sf (cca. 40 % plochy či 50 % objemu většího sféroidu), proto jsou i tak nazývány. Sféroidy vzniklé ze 4000 b/sf jsou nazývány většími. Kompaktní sféroidy byly následně exponovány testované látce až 264 hod a v průběhu expozice byla sledována jejich velikost a tvar. Po 264 hod se změřila i jejich životaschopnost pomocí metody využívající resazurin.

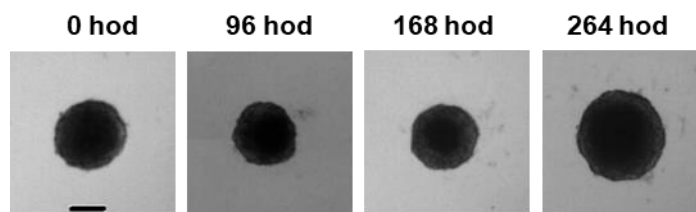
5.2.1 Hodnocení testikulární toxicity TPA

TPA způsobilo ve dvou největších koncentracích (10 a 40 nM) významné zvětšení velikosti sféroidu u obou typů sféroidů Leydigových buněk a to již po 96 hod (Obrázek 16, 18 A.–B.; Příloha 3 Obrázek 42, 43 A.–B.). U menších sféroidů došlo k výraznějšímu nárůstu sféroidů až na 200 % plochy nebo 300 % objemu neexponovaných sféroidů na konci celé expozice. U větších sféroidů se na konci expozice významný účinek TPA vytrácí. Parametry charakterizující tvar sféroidů se statisticky významně nemění v porovnání s rozpouštědlovou kontrolou (Obrázek 16, 18 C.–D.; Příloha 3 Obrázek 42, 43 C.–D.), tedy sféroidy exponované TPA si zachovávají stejný tvar po celou dobu expozice. Změnu velikosti a neměnnost tvaru sféroidů během expozice TPA lze vidět i na fotografiích (Obrázek 17, 19). TPA významně neovlivňuje životaschopnost buněk ve sféroidech (Obrázek 20), tedy ji nezmenšuje ani nezvyšuje.

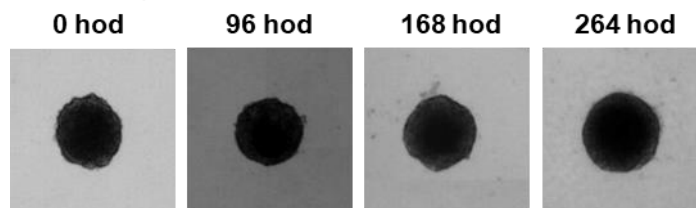


Obrázek 16: Vliv TPA na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf, koncentrace TPA: 0,6; 3; 10 a 40 nM, délka expozice: 0–264 hod. Plocha (**A.**) a objem sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kruhovitost (**C.**) a celistvost sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování $\pm$ SEM ($n = 4$). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$) nebo „^“ (Kruskal-Wallisův test, Dunnův test: ^, $P \leq 0,05$).

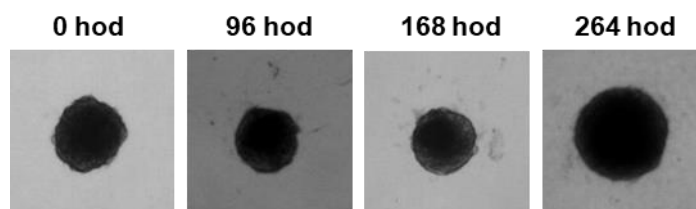
A. Rozpouštědlová kontrola (EtOH 0,25 %)



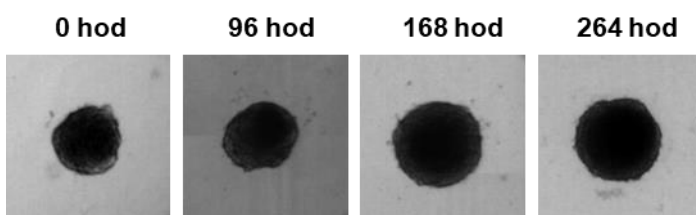
B. TPA 0,6 nM



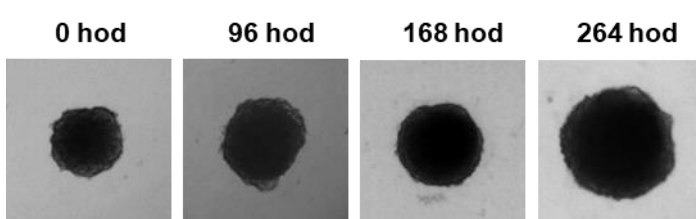
C. TPA 3 nM



D. TPA 10 nM

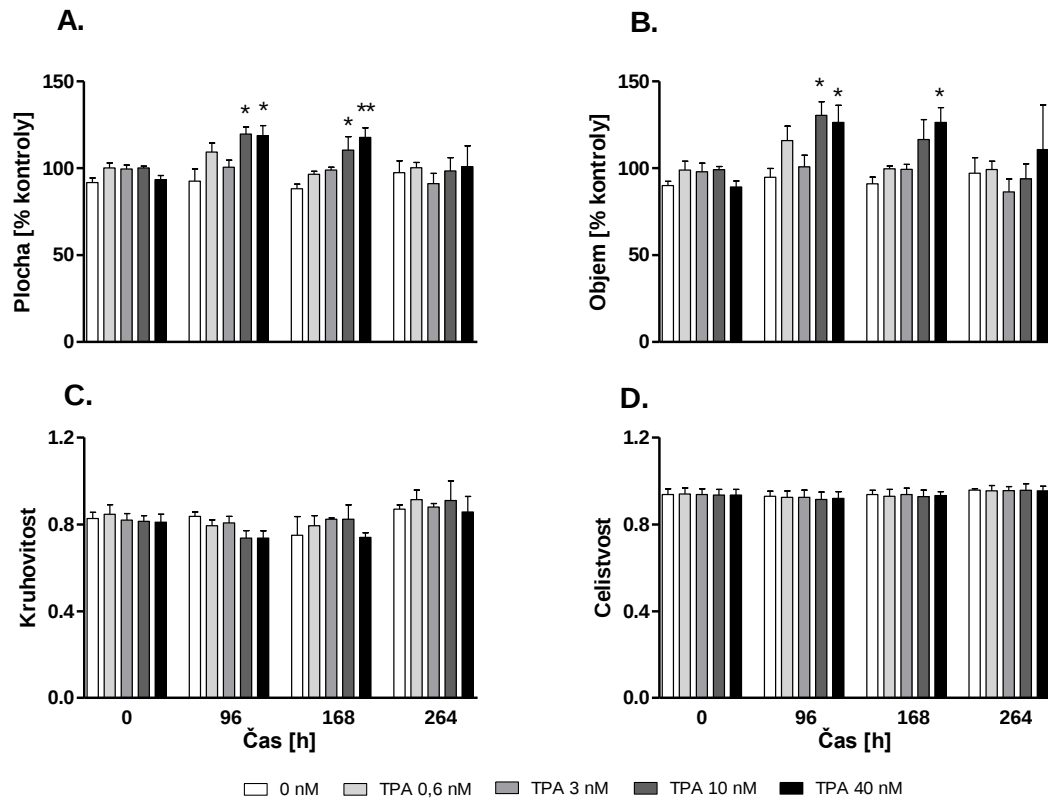


E. TPA 40 nM



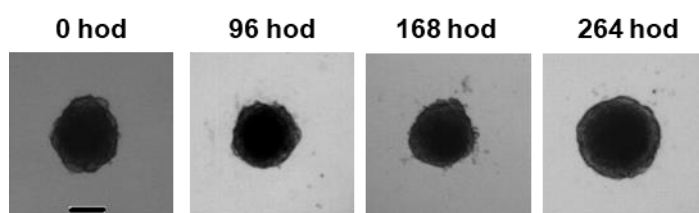
Obrázek 17: Vliv TPA na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf). (A.–E.) Reprezentativní fotografie sféroidů. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf; koncentrace TPA: 0,6; 3; 10 a 40 nM; délka expozice: 0–264 hod. Měřítka: 100 μ m (na první fotografii).

4000 b/sf

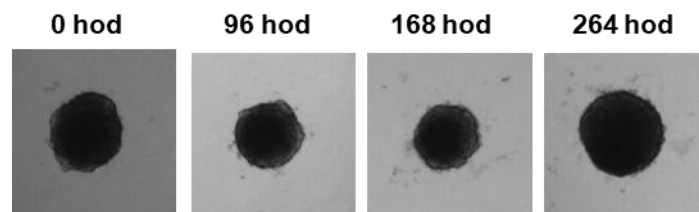


Obrázek 18: Vliv TPA na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf, koncentrace TPA: 0,6; 3; 10 a 40 nM, délka expozice: 0–264 hod. Plocha (A.) a objem sféroidů (B.) jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kruhovitost (C.) a celistvost sféroidu (D.) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování $\pm$ SEM ($n = 4$). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$).

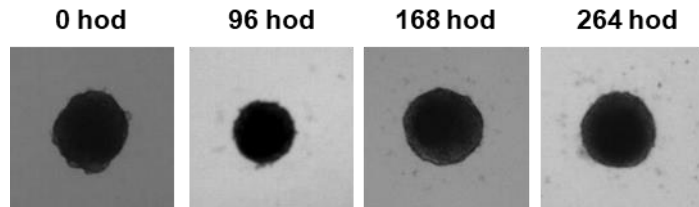
A. Rozpouštědlová kontrola (EtOH 0,25 %)



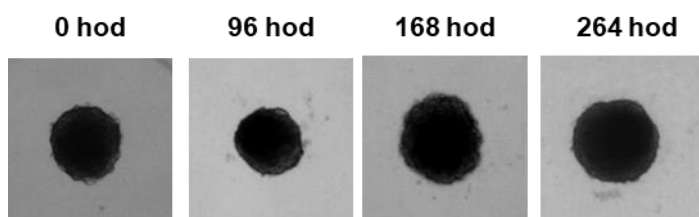
B. TPA 0,6 nM



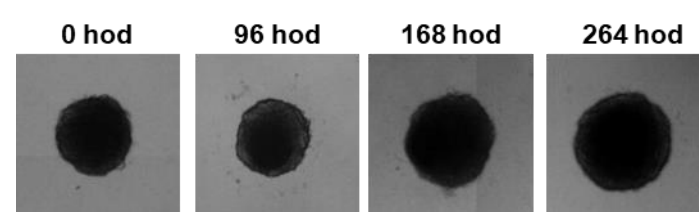
C. TPA 3 nM



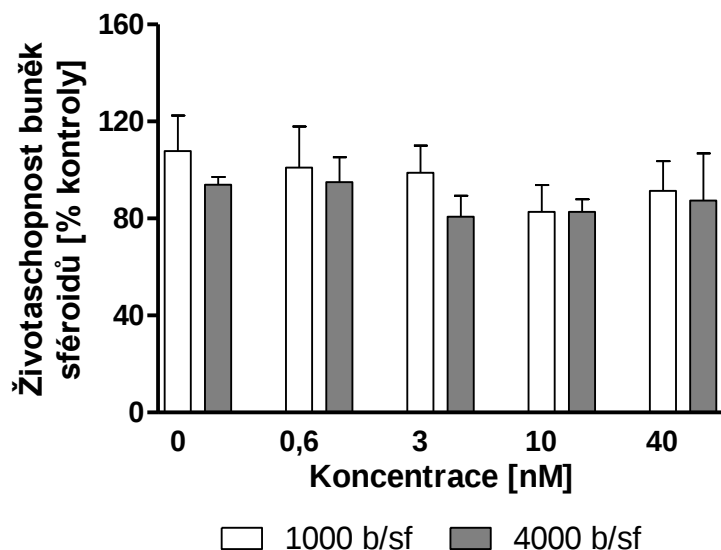
D. TPA 10 nM



E. TPA 40 nM



Obrázek 19: Vliv TPA na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf). (A.–E.) Reprezentativní fotografie sféroidů. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf; koncentrace TPA: 0,6; 3; 10 a 40 nM; délka expozice: 0–264 hod. Měřítka: 100 μ m (na první fotografii).

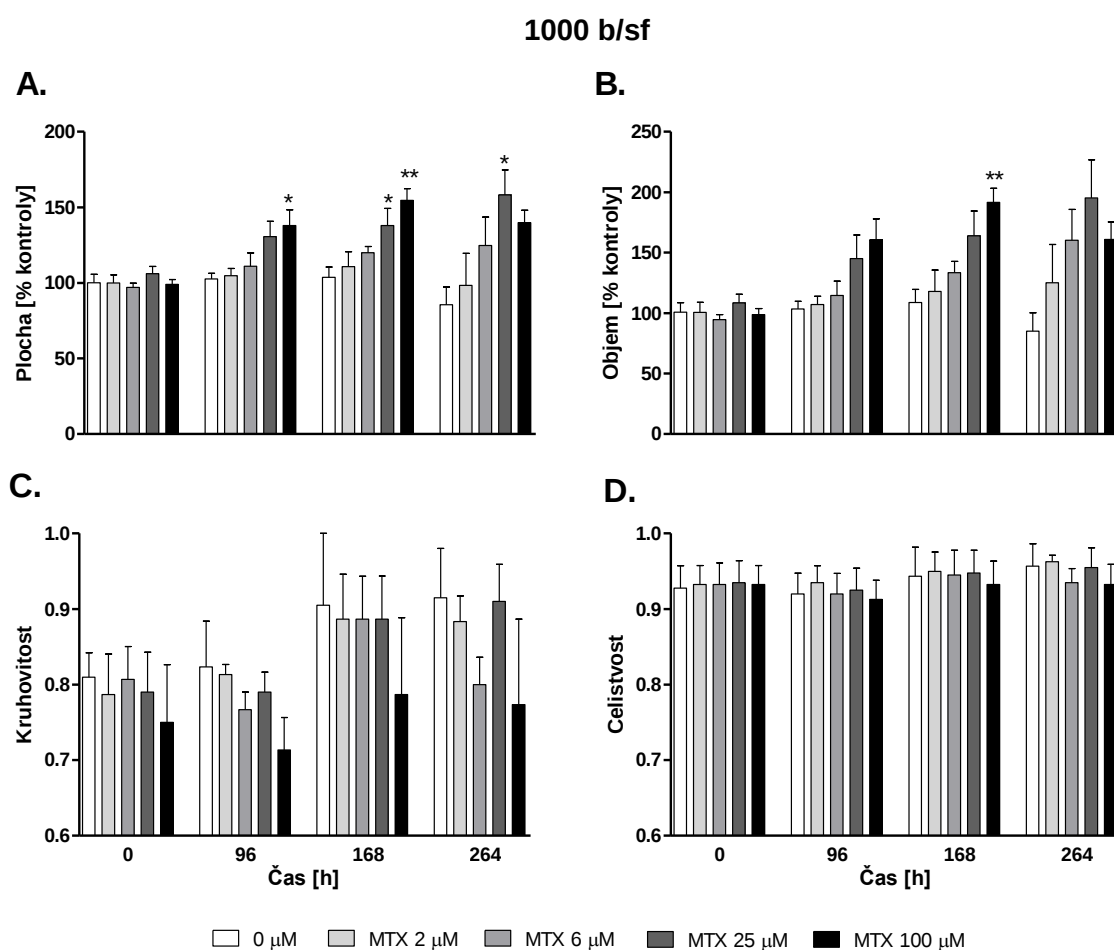


Obrázek 20: Vliv TPA na životaschopnost Leydigových TM3 sféroidů. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf a 4000 b/sf; koncentrace TPA: 0,6; 3; 10 a 40 nM; délka expozice: 264 hod. Data jsou normalizována na kontrolu (neexponované sféroidy) a prezentována jako průměr $\pm$ SEM ($n = 4$).

6.1.2 Hodnocení testikulární toxicity MTX

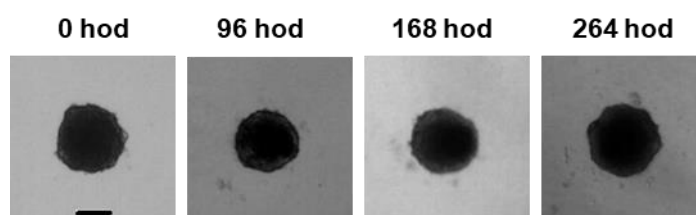
Po 96 hod expozici MTX je pozorovatelná změna parametrů charakterizujících velikost menších i větších sféroidů, která je nejvýraznější v nejvyšších koncentracích (25 a 100 μ M), kdy došlo ke zvětšení plochy i objemu sféroidů až na 200 % kontroly (Obrázek 21, 23 A.–B.; Příloha 4 Obrázek 44, 45 A.–B.). Tvar sféroidů se statisticky významně nemění v průběhu celé expozice (Obrázek 21, 23 C.–D.; Příloha 4 Obrázek 44, 45 C.–D.).

Fotografie potvrzují zvětšení velikosti sféroidů, v nejvyšší koncentraci 100 μ M lze pozorovat i roztřepený okraj menších sféroidů a narušení celého tvaru větších sféroidů (Obrázek 22, 24). Přestože MTX zvětšoval velikost sféroidů, neměl významný vliv na životaschopnost jejich buněk na konci experimentu. U koncentrace 100 μ M lze pozorovat pokles množství živých buněk u větších sféroidů, ovšem není statisticky významný (Obrázek 25).

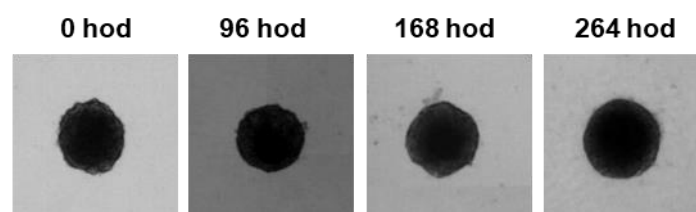


Obrázek 21: Vliv MTX na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf, koncentrace MTX: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Plocha (**A.**) a objem sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kruhovitost (**C.**) a celistvost sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 4). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$).

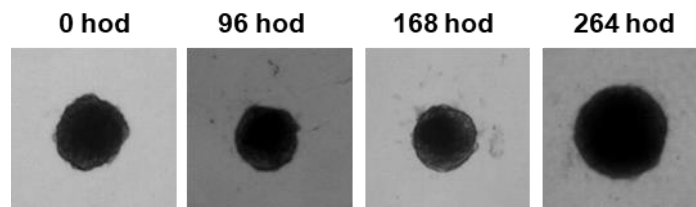
A. Rozpouštědlová kontrola (ACN 0,25 %)



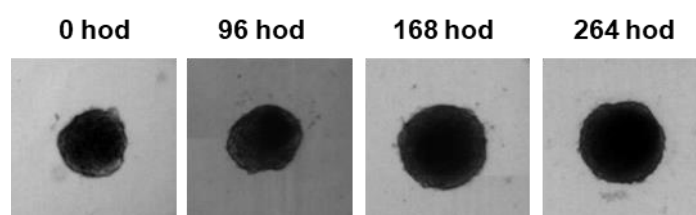
B. MTX 2 μ M



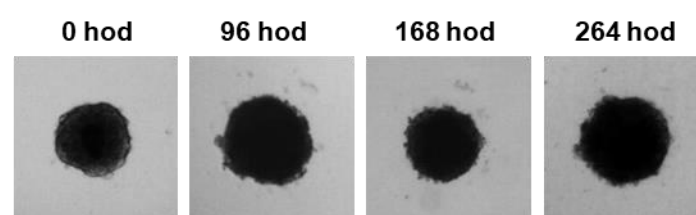
C. MTX 6 μ M



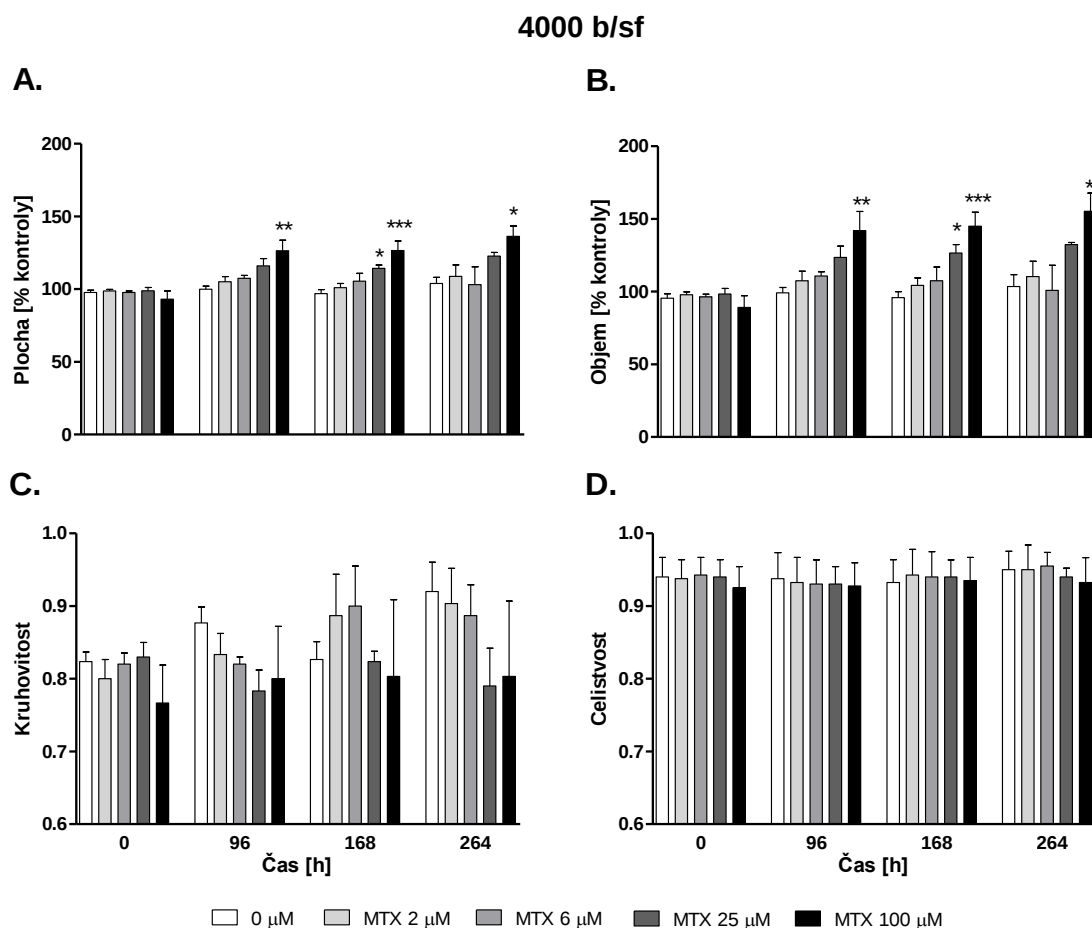
D. MTX 25 μ M



E. MTX 100 μ M

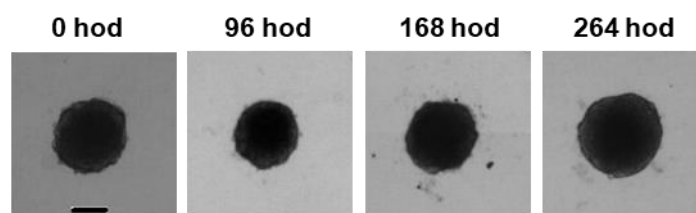


Obrázek 22: Vliv MTX na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf). (A.–E.) Reprezentativní fotografie sféroidů. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf; koncentrace MTX: 2; 6; 25 a 100 μ M; délka expozice: 0–264 hod. Měřítka: 100 μ m (na první fotografii).

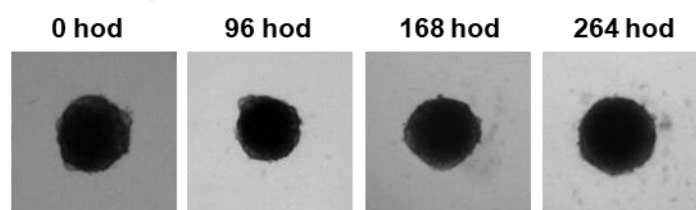


Obrázek 23: Vliv MTX na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf, koncentrace MTX: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Plocha (**A.**) a objem sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kruhovitost (**C.**) a celistvost sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 4). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$).

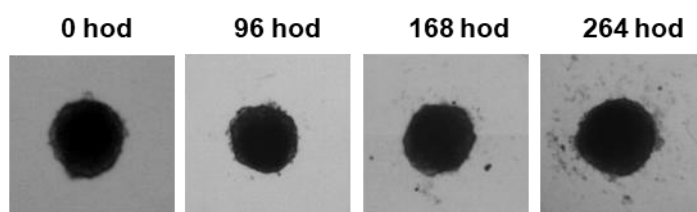
A. Rozpouštědlová kontrola (ACN 0,25 %)



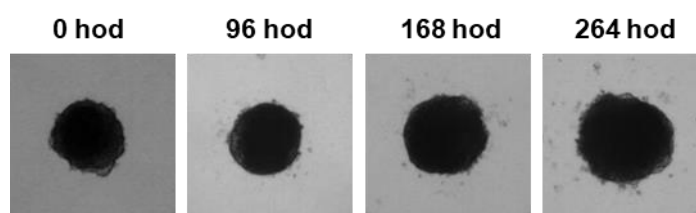
B. MTX 2 μ M



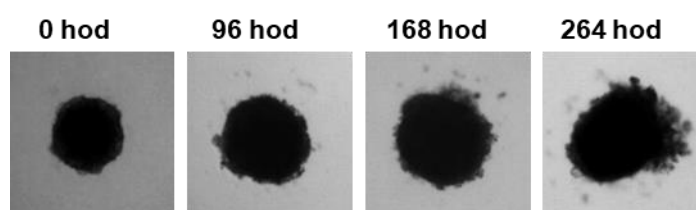
C. MTX 6 μ M



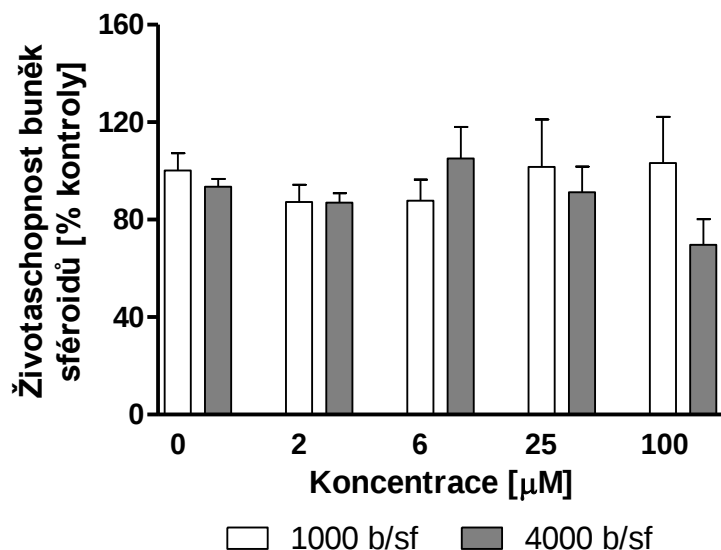
D. MTX 25 μ M



E. MTX 100 μ M



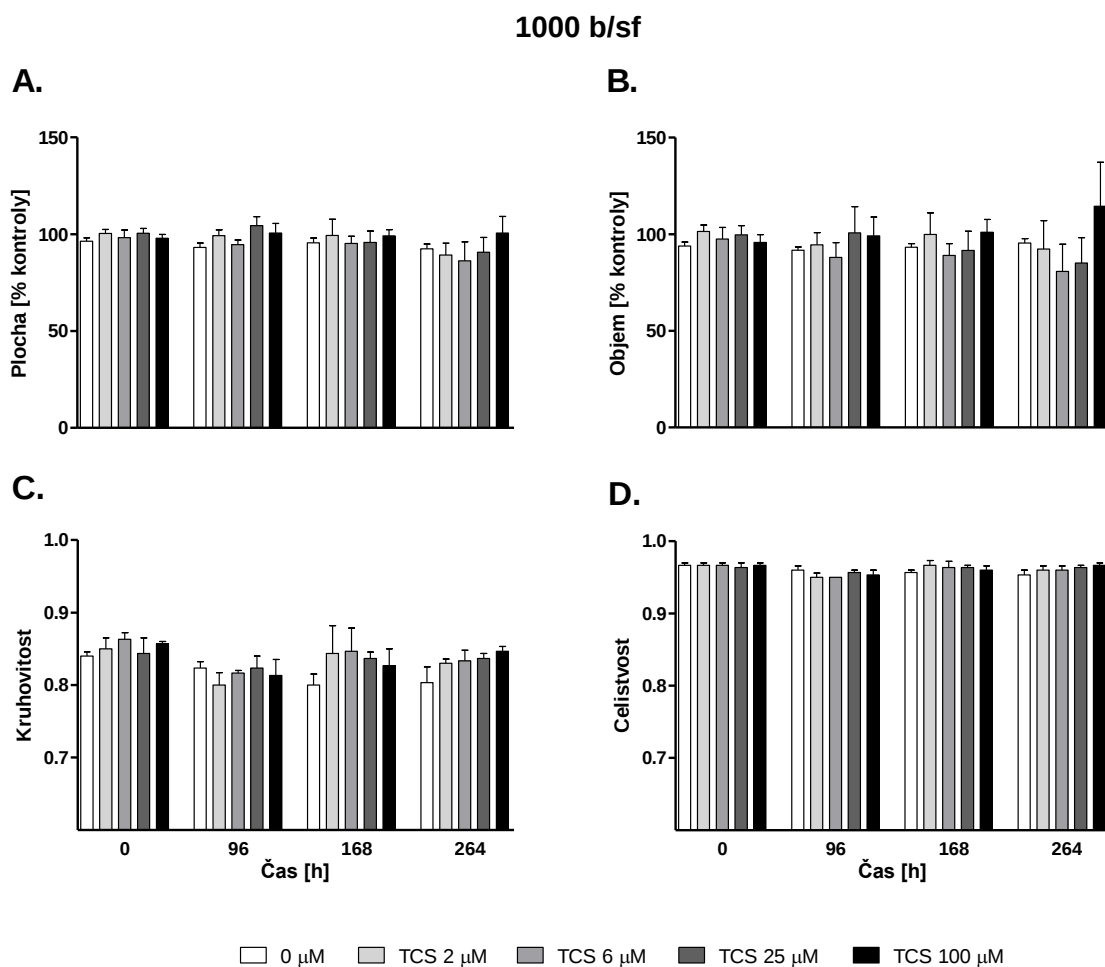
Obrázek 24: Vliv MTX na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf). (A.–E.)
Reprezentativní fotografie sféroidů. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf; koncentrace MTX: 2; 6; 25 a 100 μ M; délka expozice: 0–264 hod. Měřítka: 100 μ m (na první fotografii).



Obrázek 25: Vliv MTX na životaschopnost Leydigoých TM3 buněk ve sféroidech exponovaných MTX. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf a 4000 b/sf; koncentrace MTX: 2; 6; 25 a 100 μM; délka expozice: 264 hod. Data jsou normalizována na kontrolu (neexponované sféroidy) a prezentována jako průměr ± SEM (n = 4).

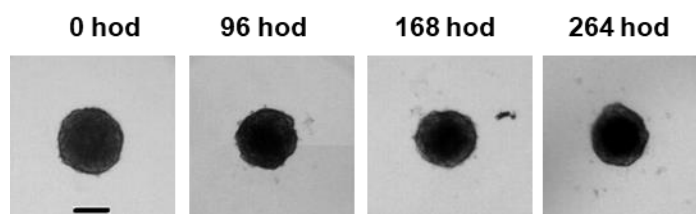
5.1.3 Hodnocení testikulární toxicity TCS

Významný vliv TCS na velikost a tvar menších (Obrázek 26 A.–D., Příloha 5 Obrázek 46 A.–D.) či větších sféroidů (Obrázek 28 A.–D., Příloha 5 Obrázek 47 A.–D.) není pozorovatelný ani v jedné koncentraci TCS. Totéž ukazují i fotografie, kde rovněž není zřetelná změna velikosti ani tvaru sféroidu (Obrázek 27, 29). Na konci experimentu nebyl zaznamenán žádný účinek TCS na životaschopnost menších či větších sféroidů kromě TCS v nejvyšší koncentraci (100 μM) a v případě větších sféroidů, kdy poklesla životaschopnost buněk sféroidů na cca 75 % kontrolních neexponovaných sféroidů (Obrázek 30).

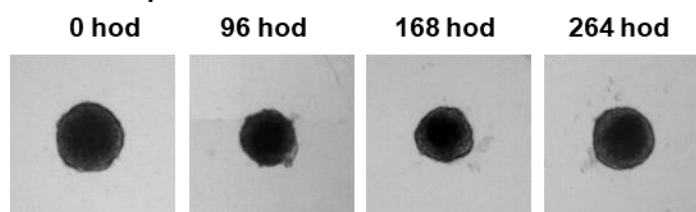


Obrázek 26: Vliv TCS na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf, koncentrace TCS: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Plocha (**A.**) a objem sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kruhovitost (**C.**) a celistvost sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 3). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test).

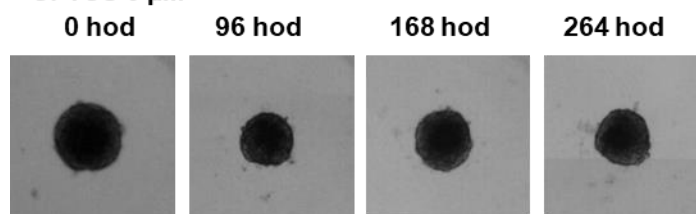
A. Rozpouštědlová kontrola (ACN 0,25 %)



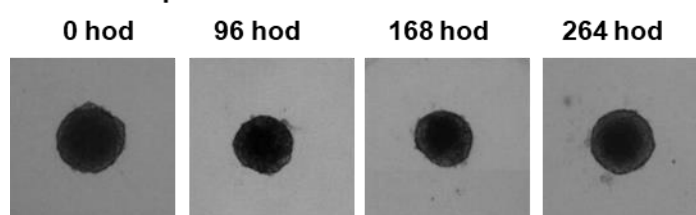
B. TCS 2 μM



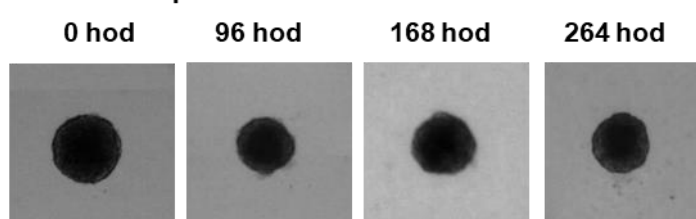
C. TCS 6 μM



D. TCS 25 μM

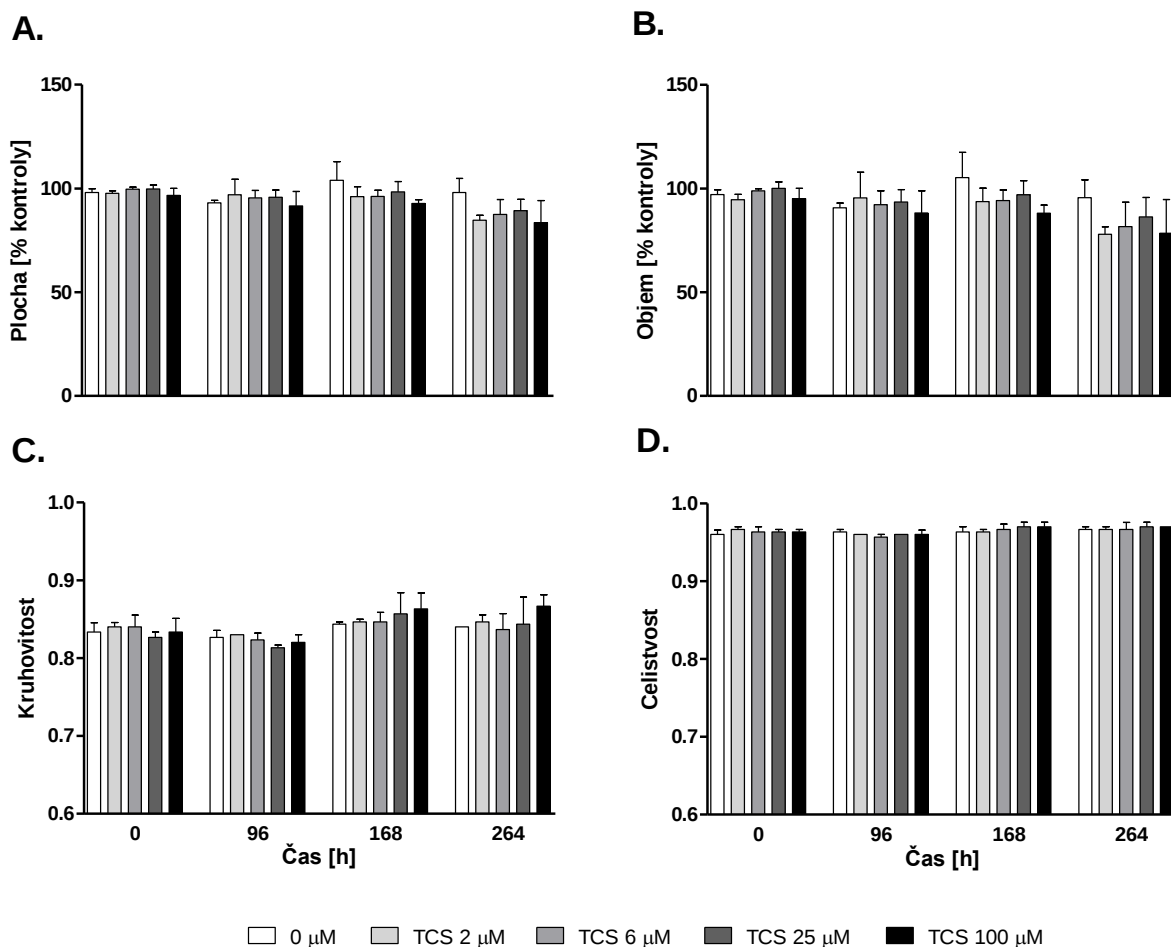


E. TCS 100 μM



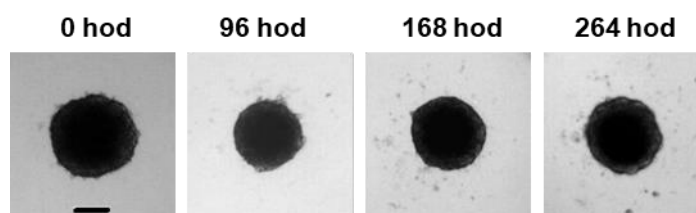
Obrázek 27: Vliv TCS na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf). (A.–E.) Reprezentativní fotografie sféroidů. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf; koncentrace TCS: 2; 6; 25 a 100 μM ; délka expozice: 0–264 hod. Měřítka: 100 μm (na první fotografii).

4000 b/sf

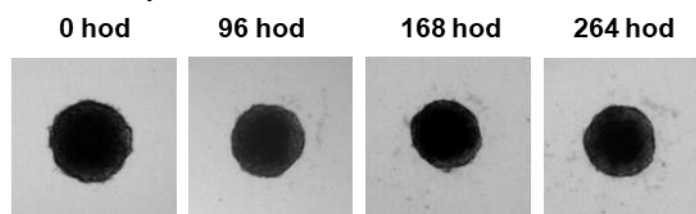


Obrázek 28: Vliv TCS na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf, koncentrace TCS: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Plocha (A.) a objem sféroidů (B.) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kruhovitost (C.) a celistvost sféroidu (D.) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 3). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test).

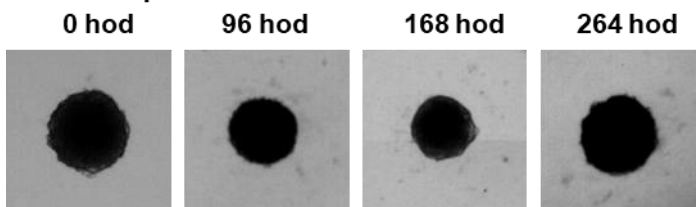
A. Rozpouštědlová kontrola (ACN 0,25 %)



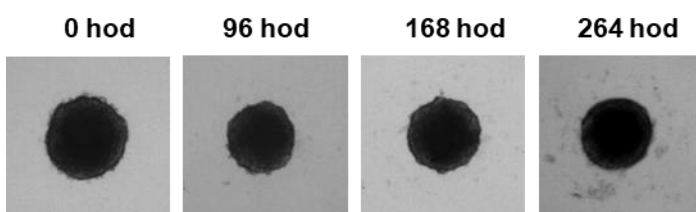
B. TCS 2 μM



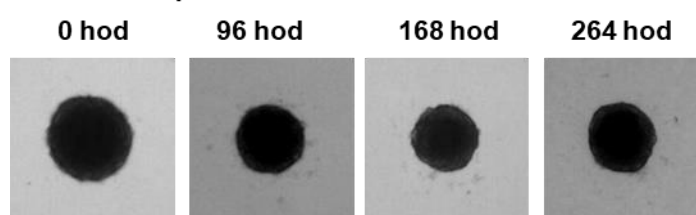
C. TCS 6 μM



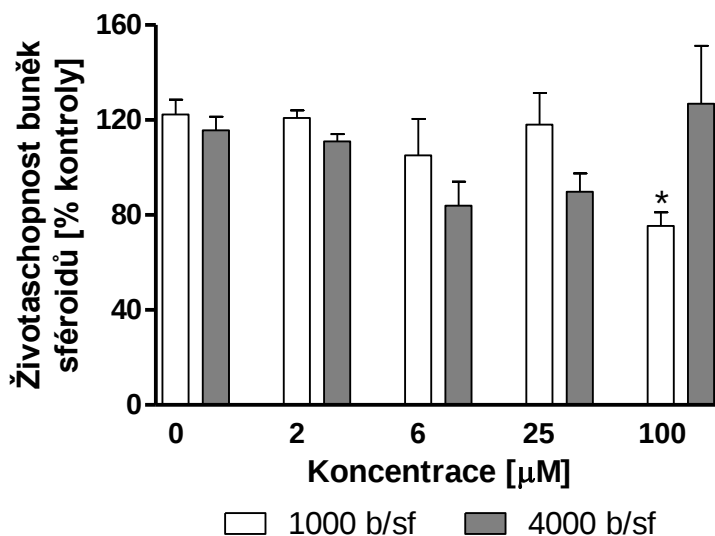
D. TCS 25 μM



E. TCS 100 μM



Obrázek 29: Vliv TCS na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf). (A.–E.) Reprezentativní fotografie sféroidů. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf; koncentrace TCS: 2; 6; 25 a 100 μM ; délka expozice: 0–264 hod. Měřítka: 100 μm (na první fotografii).



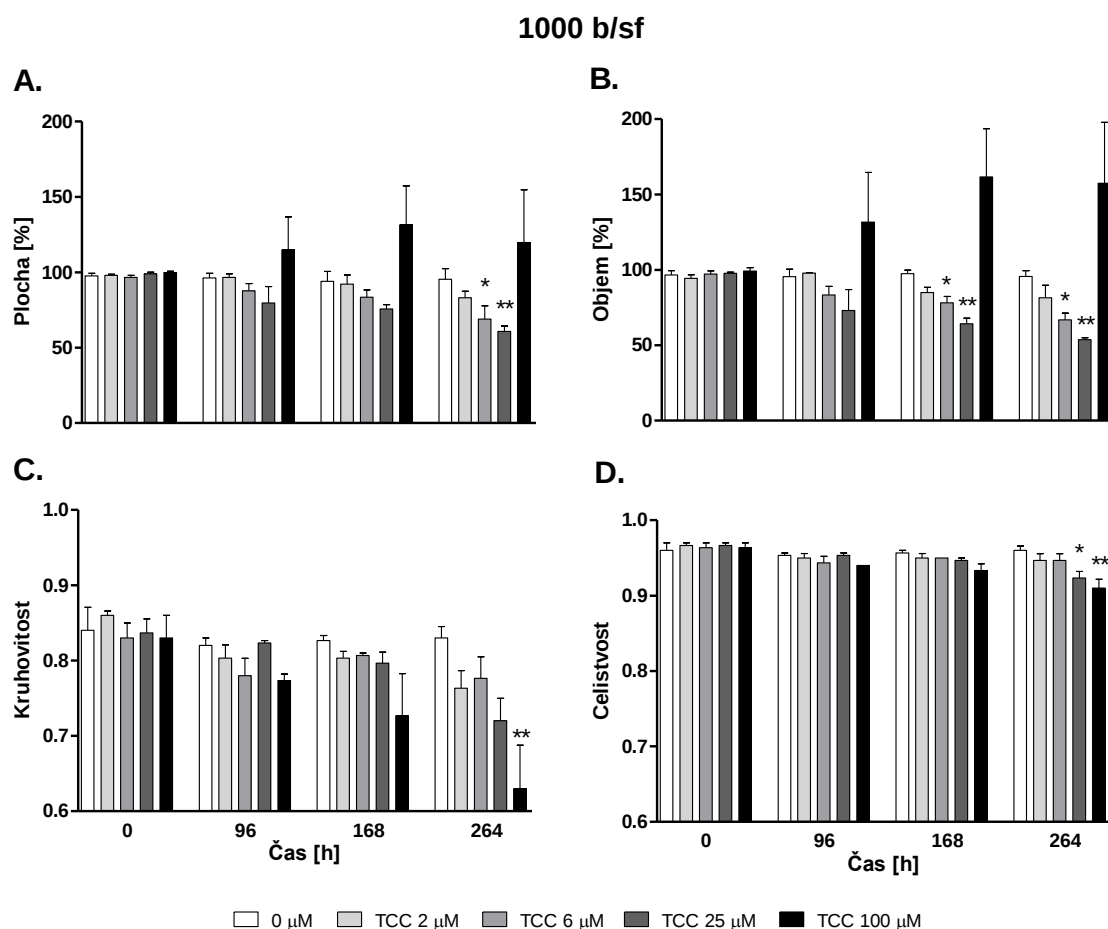
Obrázek 30: Vliv TCS na životaschopnost Leydigoých TM3 buněk ve sféroidech TCS. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf a 4000 b/sf; koncentrace TCS: 2; 6; 25 a 100 µM; délka expozice: 264 hod. Data jsou normalizována na kontrolu (neexponované sféroidy) a prezentována jako průměr ± SEM (n = 3).

5.1.3 Hodnocení testikulární toxicity TCC

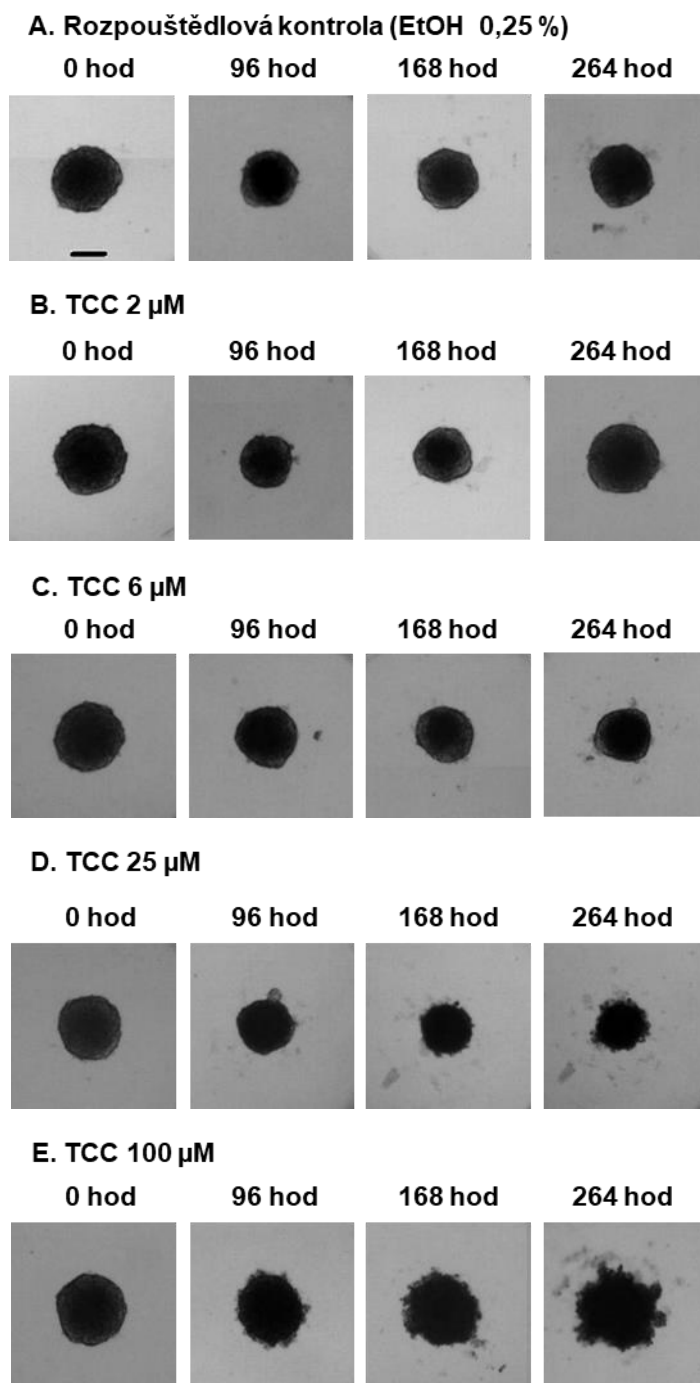
Na parametrech charakterizujících velikost sféroidů je vidět, že s rostoucím expozičním časem dochází ke koncentračně závislé změně velikosti menších i větších sféroidů (Obrázek 31, 33 A.–B.). V případě nižších koncentrací (zejména 6 a 25 µM) velikost sféroidů klesá v porovnání s kontrolními sféroidy (neexponované nebo exponované rozpouštědlem) po celou dobu expozice, v čase 264 hod je rozdíl velikosti téměř o 50 %. V případě nejvyšší koncentrace TCC (100 µM) se velikost sféroidů nemění (větší sféroidy; Obrázek 33 A.–B.; Příloha 6 Obrázek 49 A.–B.) nebo naopak zvětšuje, i když ne statisticky významně (menší sféroidy; Obrázek 31 A.–B.; Příloha 6 Obrázek 48 A.–B.). TCC ovlivňuje i tvar sféroidů, jak lze vidět na parametrech kruhovitosti a celistvosti. Statisticky významně se od kontroly odlišují sféroidy exponované koncentrací 100 µM, kde se tvar sféroidů vzdaluje ideální kruhovitosti a celistvosti (Obrázek 31, 33 C.–D.; Příloha 6 Obrázek 48, 49 C.–D.).

Změnu velikosti a tvaru sféroidu lze pozorovat i na fotografiích (Obrázek 32, 34). V nejvyšších koncentracích TCC lze pozorovat rozvolnění okraje i celého sféroidu a v nejvyšší koncentraci i náznak rozpadu sféroidu.

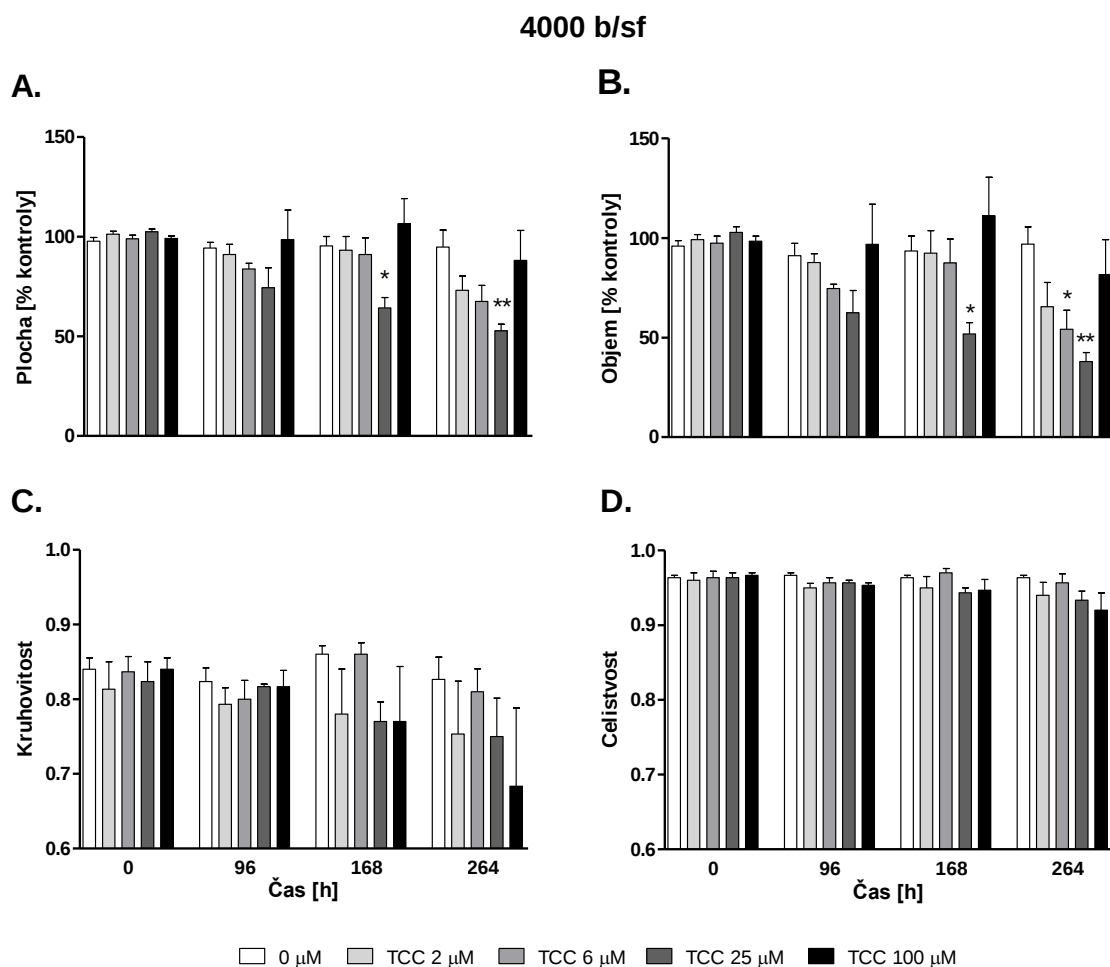
TCC způsobil nejen narušení velikosti a tvaru menších i větších sféroidů Leydigových TM3 buněk, ale i snížil jejich životaschopnost (Obrázek 35). V koncentraci 25 µM se snížila životaschopnost exponovaných menších i větších sféroidů na 50 % kontrolních sféroidů, v případě 100 µM dokonce až na 20 %.



Obrázek 31: Vliv TCC na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf, koncentrace TCC: 2; 6; 25 a 100 μ M, délka expozice: 0–264 hod. Plocha (A.) a objem sféroidů (B.) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kruhovitost (C.) a celistvost sféroidu (D.) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování $\pm$ SEM ($n = 3$). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$).

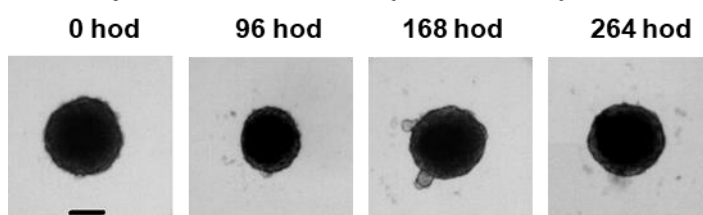


Obrázek 32: Vliv TCC na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf). (A.–E.) Reprezentativní fotografie sféroidů ze třech nezávislých experimentů. Koncentrace TCC: 2; 6; 25 a 100 μ M. Délka expozice: 0–264 hod. Měřítko: 100 μ m (na první fotografii).

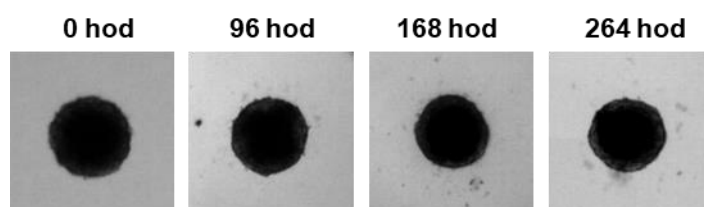


Obrázek 33: Vliv TCC na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf, koncentrace TCC: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Plocha (**A.**) a objem sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kruhovitost (**C.**) a celistvost sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 3). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01).

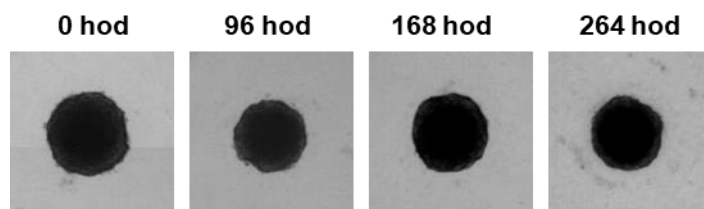
A. Rozpouštědlová kontrola (EtOH 0,25 %)



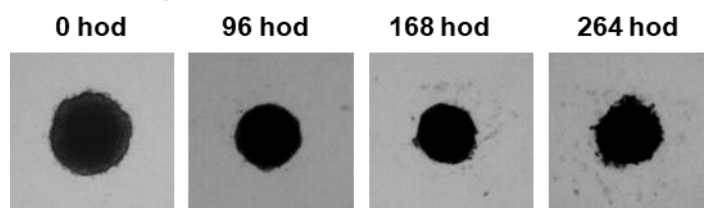
B. TCC 2 μ M



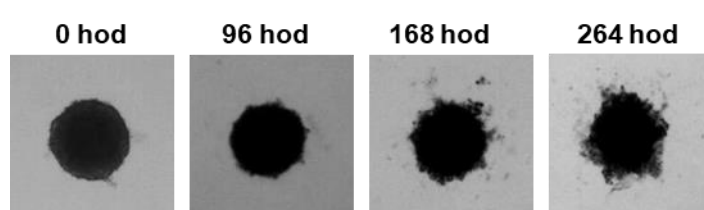
C. TCC 6 μ M



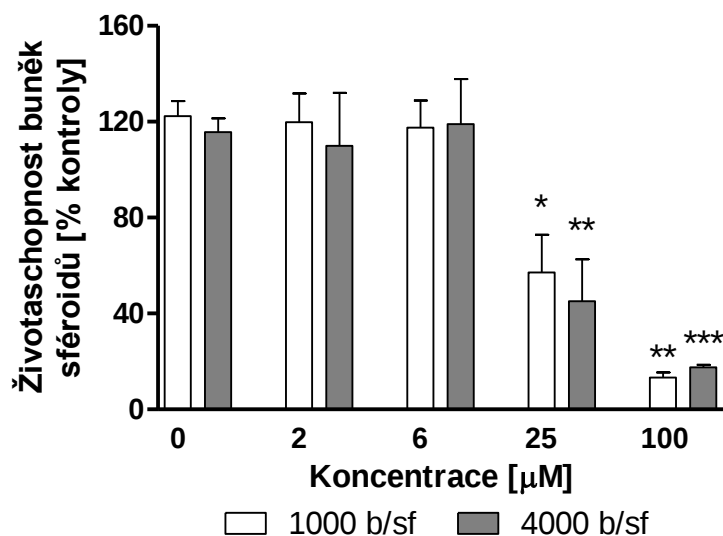
D. TCC 25 μ M



E. TCC 100 μ M



Obrázek 34: Vliv TCC na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf). (A.–E.) Reprezentativní fotografie sféroidů ze 3 nezávislých experimentů. Koncentrace TCC: 2; 6; 25 a 100 μ M. Délka expozice: 0–264 hod. Měřítka: 100 μ m (na první fotografii).



Obrázek 35: Vliv TCC na životaschopnost Leydigových TM3 buněk ve sféroidech. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf a 4000 b/sf; koncentrace TCC: 2; 6; 25 a 100 µM; délka expozice: 264 hod. Data jsou normalizována na kontrolu (neexponované sféroidy) a prezentována jako průměr ± SEM (n = 3).

6 Diskuze

6.1. 3D model Leydigových buněk

Hlavním cílem práce bylo posoudit vliv čtyř vybraných chemických látek na velikost a tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk a na jejich životaschopnost. Před zkoumáním vybraných látek bylo potřeba nejprve optimalizovat podmínky kultivace multicelulárních sféroidů Leydigových TM3 buněk, vybrat optimální počáteční koncentraci buněk a dobu kultivace sféroidů před vlastní expozicí a zvolit vhodné kultivační médium. Na základě výsledků z kultivací sféroidů nasazených v různých počátečních koncentracích byly zvoleny pro posuzování vlivu zvolených látek na kompaktně vytvořené sféroidy počáteční koncentrace 4000 b/sf (větší sféroidy) a 1000 b/sf (menší sféroidy) a doba pro tvorbu a formování sféroidů před expozicí 96 hod. Dalším optimalizačním krokem bylo posouzení vlivu složení kultivačního média na tvorbu a formování sféroidů a na jejich životaschopnost. Médium doporučené ATCC obsahuje fenolovou červeň (Médium I), která má pravděpodobně slabé estrogenní účinky a mohla by ovlivňovat citlivost Leydigových buněk ke zkoumaným látkám (Berthois et al., 1986; Węsierska-Gądek et al., 2007). Médium II mělo složení stejné jako Médium I s tím rozdílem, že neobsahovalo fenolovou červeň. Výsledky ukázaly, že fenolová červeň v Médii I neměla žádný vliv na Leydigovy buňky ani tvorbu, růst či morfologii sféroidů. Médium III bylo opět bez fenolové červně, ale místo koňského a fetálního séra obsahovalo fetální sérum se snížením obsahem hormonů i jiných

hydrofilních látek, např. růstových faktorů a mastných kyselin (Vanetti et al., 2017). U sféroidů kultivovaných v médiu se sníženým obsahem hormonů došlo k pozvolnějšímu poklesu velikosti vytvořených sféroidů během prvních dnů kultivace a naopak k nárůstu jejich velikosti, ke konci kultivace, zejména u variant s nižším počtem nasazených buněk. Jedním z možných vysvětlení tohoto rozdílu v chování sféroidů v médiu se sníženým obsahu hormonů oproti kompletnímu kultivačnímu médiu je to, že Leydigovy TM3 buňky ve sféroidech kultivovaných v médiu s normálním obsahem hormonů se diferencovaly z nezralých Leydigových buněk do zralých Leydigových buněk a příliš se již nedělily. Oproti tomu v Médium III vlivem sníženého množství hormonů nediferencovaly do dalšího stádia Leydigových buněk a zachovaly si možnost dělit se. Podobně se chovaly mesenchymální kmenové buňky kultivované ve 3D sféroidech, v bez sérovém médiu si zachovaly vyšší proliferační a diferenciační potenciál (Alimperti et al., 2014). K potvrzení této hypotézy je potřeba dalších experimentů, které se zaměří na markery vývojových stádií Leydigových buněk ve vytvořených sféroidech a porovná je v závislosti na složení média. Na základě tohoto optimalizačního kroku bylo pro další experimenty zvoleno Médium II, tedy kompletní kultivační médium doporučené ATCC, ale bez fenolové červeně.

Jako modelový toxikant pro optimalizaci metody stanovující životaschopnost buněk ve sféroidech Leydigových TM3 buněk byl zvolen azid sodný (NaN_3), který byl toxický na sferoidy tvořené jaterními kmenovými buňkami HL1 v koncentraci 150 mM (Váňová, 2016). Měření životaschopnosti (metabolické aktivity) buněk pomocí resazurinu se potvrdilo jako vhodná metoda pro posouzení životaschopnosti buněk v těchto sféroidech. Jedná se o nedestruktivní metodu, která nevyžaduje extrakci ani destrukci buněk a barvivo není pro buňky toxické. Umožňuje to tedy následné využití sféroidů, např. pro měření exprese důležitých genů. Tato metoda má však podstatnou nevýhodu pro stanovení životaschopných buněk ve sféroidech. Není totiž jisté, do jaké hloubky (vrstvy) sféroidu resazurin penetruje během 4 hod inkubace, tedy nelze s jistotou říci, že tato metoda měří životaschopnost všech buněk tvořících sféroid a ne pouze buněk na povrchu. Podobnou limitaci trpí metoda využívající neutrální červeň (Musilová, 2017). Další nedestruktivní metody využívají např. měření množství laktátu nebo enzymu laktátdehydrogenázy (LDH) v médiu. Metody destruktivní stanovující např. množství LDH, ATP nebo enzymu kyselá fosfatázy přímo v kultuře (ve sféroidech) nejsou limitovány pronikáním barvicí látky do hlubších vrstev sféroidů. Vyžadují však disociaci sféroidů, takže už není možné buňky použít pro další studium (Cimr, 2016). Nejvhodnější by tedy bylo pro posuzování vlivu chemických látek na životaschopnost buněk tvořících sferoidy využít kombinaci metod, aby se limitovaly možné nevýhody a bylo získáno více informací. Vhodnou kombinací by např. bylo měření laktátu a LDH v médiu v kombinaci s metodou využívající resazurin a s metodou stanovující ATP nebo alkalickou fosfatázu přímo ve sféroidech.

6.2 Hodnocení testikulární toxicity

Po všech optimalizačních krocích byly model i příslušné metody připraveny pro hodnocení testikulární toxicity vybraných látek. Hodnocena byla modelová látka TPA a relevantní kontaminanty životního prostředí MTX, TCS a TCC (Tabulka 3). Již dříve byla hodnocena testikulární toxicita těchto látek ve 2D modelu na monovrstvě Leydigových TM3 buněk (Yawer et al., v přípravě). Možná testikulární toxicita těchto látek byla stanovena na základě jejich cytotoxického působení na tyto buňky a na základě schopnosti těchto látek narušovat mezibuněčnou komunikaci mezerovými spoji („gap junction intercellular communication“ – GJIC) mezi těmito buňkami. GJIC mezi Leydigovými buňkami je zapojena do regulace jejich proliferace, diferenciací a apoptózy a je nezbytná pro správnou produkci androgenů a kontrolu steroidogeneze. GJIC v Leydigových buňkách pravděpodobně hraje roli při produkci androgenů (Dydowiczová, 2011). Na základě těchto výsledků lze říci, že ve 2D modelu Leydigových TM3 buněk se TPA ukázal jako necytotoxický inhibitor GJIC s IC_{50} (inhibiční koncentrace pro 50 % GJIC oproti kontrole) ~ 10 nM po 0,5; 6 a 24 hod (Yawer et al., v přípravě). Podobně se choval i MTX, který byl také necytotoxický až do koncentrace $100 \mu\text{M}$ (24 hod expozice), ale rychle zavíral GJIC s $IC_{50} \sim 40 \mu\text{M}$ po 0,5; 6 a 24 hod. **TCS** se ukázal jako cytotoxický s $IC_{50} \sim 40\text{--}90 \mu\text{M}$ po 24 hod. V subcytotoxických koncentracích také zavíral GJIC s $IC_{50} \sim 30\text{--}50 \mu\text{M}$ po 0,5; 6 a 24 hod. Naproti tomu TCC byl cytotoxický po 24 hod pouze v nejvyšší koncentraci toxický ($100 \mu\text{M}$ – pokles životaschopnosti o 20–40 %). GJIC zavíral v nižších netoxických koncentracích s $IC_{50} \sim 25\text{--}50 \mu\text{M}$ po 0,5; 6 a 24 hod (zaznamenán mírný nárůst v čase). Uvedené výsledky odrážejí působení látek na Leydigovy buňky rostoucí ve 2D uspořádání, tedy v monovrstvě. V předložené práci byla hodnocena možná testikulární toxicita daných látek ve 3D modelu těchto buněk, která více připomíná *in vivo* prostředí. Dle studie na 2D modelu byly zvoleny koncentrace studovaných látek.

Modelový nádorový promotor **TPA** (Méchali et al., 1983) se ukázal jako možný stimulátor buněčného růstu Leydigových buněk tvořících sféroid. V nejvyšších koncentracích (10 a 40 nM) na konci doby expozice sféroidy zvětšily svoji plochu dvojnásobně a objem trojnásobně v porovnání s kontrolními sféroidy. Tvar sféroidů se neměnil. Test životaschopnosti ukázal TPA jako netoxický, podobně jako ve 2D kultuře (Yawer et al., v přípravě). Možný vliv TPA na samčí reprodukci byl zkoumán *in vitro* na primárních testikulárních buňkách potkanů, kdy se ukázal pokles syntézy testosteronu Leydigových buněk (ED_{50} 10 ng/ml; Welsh et al., 1984).

MTX po 264hod expozici způsobil změnu velikosti sféroidů v nejvyšších koncentracích 25 a $100 \mu\text{M}$, ovšem test životaschopnosti neukázal, že by MTX působil toxicky na Leydigovy buňky, čímž se potvrdil výsledek experimentů provedených ve 2D uspořádání (Yawer et al., v přípravě). Z fotografií je však vidět rozvolněný okraj zejména u větších sféroidů. Jelikož MTX ve 2D modelu uzavírá GJIC mezi Leydigovými TM3 buňkami v podobných koncentracích (Yawer et al., v přípravě), k narušení GJIC mezi

buňkami mohlo dojít i ve 3D modelu, což dále zřejmě vede i k narušení struktury a tvaru sféroidů. Bylo by potřeba potvrdit hypotézu, že cílem MTX ve 3D modelu je také mezibuněčná komunikace mezerovými spoji GJIC a příslušné stavební jednotky konexiny 43 (Pointis 2010), např. metodou 3D FRAP (Tylcz et al., 2013).

V těle organismu se MTX metabolizuje na 2,2-bis(*p*-hydroxyfenyl)-1,1,1-trichloroethan (HPTE), který může být zodpovědný za endokrinně-disruptivní účinky MTX a mít možný negativní účinek na produkci testosteronu. U HPTE se zkoumal vliv na produkci testosteronu u různých typů Leydigových buněk z potkana kultivovaných *in vitro*. U PLCs a ILCs se produkce testosteronu snížila již po 10 hod, v případě ALCs byla snížená produkce testosteronu zaznamenána až po 18 hod expozice, což dokazuje vliv metabolizovaného MTX na produkci testosteronu a citlivost Leydigových buněk v ranějších fázích vývoje (Akingbemi et al., 2000). Narušení tvorby testosteronu vlivem HPTE byl potvrzen i ve studii provedenou Murono and Derk (2004), kdy byl významný pokles tvorby testosteronu zaznamenán v koncentraci 100 nM. Metabolit HPTE má tedy pravděpodobně negativní vliv na správnou funkci samčího reprodukčního systému narušením syntézy testosteronu. V budoucnu by bylo vhodné změřit množství produktů vzniklých metabolismem MTX (např. HPTE) v Leydigových TM3 buňkách ve 3D modelu, zda má potenciál MTX metabolizovat a mohl by být zodpovědný za negativní účinky MTX na Leydigovy buňky ve 3D modelu.

MTX dříve sloužil jako organochlorový pesticid, jeho výroba byla přerušena a nyní se MTX v České republice nepoužívá (Holoubek a kol. 2006), v některých zemích (rozvojové země) však stále tvoří jednu ze složek pesticidních postřiků k ochraně plodin (Mohammed and Boateng, 2017). V České republice se sleduje jeho koncentrace v půdě i pitné a povrchové vodě. MTX byl detekován ve vzorcích půd z různých oblastí České republiky (horské oblasti a lesní půdy) v koncentracích 0,17–0,79 ng/g půdy, tedy z míst, kde MTX pravděpodobně aplikován nikdy nebyl a dostal se tam dálkovým transportem (Holoubek a kol. 2006). Obsah MTX v pitné vodě nepřesahuje stanovený limit 0,1 µg/l (Michalová a Stehnová), při měření MTX v povrchových vodách v letech 2010–2011 nebyl MTX detekován (Procházková a kol., 2012).

Akceptovaný denní příjem (ADI) MTX pro člověka je 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti/den (Ruprich et al., 2009). Člověk může být MTX exponován kromě pitné vody, kde jsou ovšem koncentrace MTX velmi nízké, také rezidui MTX v potravinách. V letech 2008/2009 se v České republice prováděl výzkum reziduí MTX v různých potravinách, kdy pouze v jednom z 3696 analyzovaných vzorků byl zaznamenán MTX (Ruprich et al., 2009). Výskyt reziduí MTX je však považován na náhodný a neohrožující zdraví populace v ČR, odhad průměrné expoziční dávky MTX totiž činil méně než 0,1 % ADI a je stabilně nízký (Ruprich et al., 2009). Ovšem v Ghaně, kde se MTX používá jako pesticid, byla provedena studie reziduí pesticidů na rajčatech a MTX byl detekován v koncentraci 0,001 mg/kg. Analýza rizik ukázala, že se nejedná o koncentraci ohrožující zdraví konzumentů (Mohammed and Boateng, 2017).

Přijetím MTX člověkem je možné také konzumací živočichů, např. ryb, jelikož MTX má pravděpodobně i schopnost bioakumulace ve tkáních, jak ukázala studie bioakumulace organochlorových pesticidů (zahrnujících i methoxychlor) v rybách (oblast jižní Afriky), což mimo jiné i svědčí o znečištění životního prostředí organochlorovými pesticidy a představuje i možné nebezpečí bioobohacování pro konzumenty v těchto oblastech (Buah-Kwofie et al., 2018).

TCS nezpůsobil změnu velikosti ani tvaru sféroidu, jeho cytotoxický účinek se prokázal, ovšem pouze v nejvyšší koncentraci 100 μM u menších sféroidů, jejichž životaschopnost buněk poklesla zhruba o třetinu v porovnání s kontrolou. Ve 2D modelu působil TCS mnohem toxičtěji, významný pokles životaschopnosti buněk byl v koncentracích 40 μM a výše (Yawer et al., v přípravě).

TCS byl testován i na linii Leydigových buněk BLTK1 pěstovaných ve 2D modelu ve 24jamkové desce. V koncentraci 30 μM se TCS neprokával jako toxický (Forgacs et al., 2012), což odpovídá i výsledkům zjištěných v této studii i ve studii Yawer et al. (v přípravě). TCS neměl vliv na produkci testosteronu (koncentrace 0,01–10 μM) v *in vitro* modelu steroidogeneze založeném na buněčné linii adrenokortikálních buněk H295R, ale mírně zvyšoval produkci estrogenu (koncentraci 3 μM a výše) (Farmer et al., 2018). Zdá se, že testikulární toxický potenciál TCS není dle některých studií vysoký ani *in vivo* TCS neprokával významný účinek na kvalitu ani kvantitu spermií v Hershbergerově testu na potkaních v koncentracích přesahujících akceptovaný denní příjem TCS pro člověka (3 a 10 $\times$ vyšší dávky TCS než je akceptovaný denní příjem TCS pro člověka, ADI = 0,08 mg/kg tělesné hmotnosti/den; Pernoncini et al., 2018). TCS neměly negativní účinek na motilitu, viabilitu či histologickou morfometrii spermií (Pernoncini et al., 2018). Podobně dopadl i další Heshbergerův test s koncentracemi TCS 50 nebo 200 mg/kg váhy/den, ukázal se nevýznamná redukce na hmotnost testikulární tkáně (Farmer et al., 2018).

Ovšem některé studie uvádí negativní působení TCS na syntézu androgenů i dalších hormonů hrajících důležitou úlohu při reprodukci *in vivo*. U potkanů exponovaných TCS po dobu 60 dní byl zjištěn pokles proteinu regulujícího testikulární steroidogenezi (StAR), AR a dalších parametrů zapojených do testikulární steroidogeneze. Byl zaznamenán i pokles LH, FSH a testosteronu v krevním séru. Histopatologické analýzy ukázaly malformace varlat i přídatných pohlavních žláz (Kumar et al., 2009). TCS jako endokrinní disruptor označili i Wang and Tian (2015). Nedávno byla provedena studie s náhodně vybranými muži s normální koncentrací spermií, od kterých byly odebrány vzorky moči a spermatu. Zjišťoval se vztah TCS detekovaného v moči a kvalitou spermatu. Analýza (plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií) potvrdila pozitivní vztah mezi množstvím TCS v moči a množstvím morfometricky abnormálních spermií (Jurewicz et al., 2018).

TCS je prioritní látka z důvodu vysokého objemu produkce, proto je sledován i jeho výskyt a množství v životním prostředí. Díky svým antibakteriálním účinkům tvoří složku PCPs (např. zubní pasty, deodoranty, mýdla, krémy, čisticí prostředky). V některých zemích, např. Kanada 2007, platí pro

člověka maximální obsah pro lokálně aplikované produkty (dermální expozice) je povolen maximální obsah TCS 0,3 % (w/w) a pro orální užití 0,03 % (w/w; Olaniyan et al., 2016). TCS je obsažen asi ve 200 různých produktech, primární kontakt s TCS má člověk zejména při použití mýdel, zubních past, deodorantů a dalších PCPs (Olaniyan et al., 2016). Riziko expozice TCS hrozí člověku i v pracovním prostředí, kde může dojít k dermální či inhalační expozici, bohužel toxikologická data o inhalaci TCS u člověka zatím chybí (Olaniyan et al., 2016). Člověk může být exponován TCS i přes zpomalovače hoření, kam je přidáván (Christen et al., 2010). TCS může být přijat do organismu i prostřednictvím ovoce či zeleniny, jelikož rostliny mají pravděpodobně schopnost ho bioakumulovat (např. hlávkový salát – zavlažování odpadními vodami, hnojení), totéž platí i pro vodní živočichy. V ředkvičkách byla naměřena koncentrace TCS 31,8 $\mu\text{mol/kg}$ sušiny (dw), přičemž koncentrace TCS v půdě byla 34, 2 $\mu\text{mol/kg}$ (dw), rostliny tedy přijímají TCS z půdy ve velké míře (Olaniyan et al., 2016).

Nadměrné užívání PCPs má za následek vysoký obsah TCS v odpadních vodách, které odchází z domácností. TCS se může touto cestou dostávat do životního prostředí. Obsah TCS se ve vodách pečlivě sleduje, v povrchových vodách je koncentrace TCS od 7,9 do 39 nM. Odpadní vody před vyčištěním běžně obsahují 297,7 nM TCS a po vyčištění odpadních vod se koncentrace TCS sníží na 0,41–3,5 nM (Olaniyan et al., 2016). TCS se objevuje i v pitné vodě, navíc má schopnost bioakumulace i nejen v rostlinách, ale i v lidském těle. Lze ho detekovat v tukové tkáni, moči, krvi, mateřském mléku i nehtech (Olaniyan et al., 2016). ADI TCS pro člověka je 0,3 mg/kg váhy (Olaniyan et al., 2016).

TCC ovlivňoval velikost, tvar i životaschopnost sféroidů Leydigových TM3 buněk. S rostoucí koncentrací TCC klesala velikost sféroidů, pouze v nejvyšší koncentraci (100 μM) velikost neklesala, naopak v porovnání s kontrolními sféroidy se zvětšovala. V nejvyšší koncentraci (100 μM) se měnil i tvar sféroidů, což dokládají fotografie, kde je vidět rozpad sféroidů, což zřejmě odráží změnu tvaru i zvětšení velikosti sféroidů. Při hodnocení životaschopnosti se ukázalo toxické působení v koncentracích 25 a 100 μM u menších i větších sféroidů, přičemž ve 2D modelu se TCC projevil toxicky pouze v nejvyšší koncentraci 100 μM (Yawer et al., v přípravě). Cytotoxické působení na Leydigovy TM3 buňky a možná i zavírání GJIC se zřejmě odráží na rozpadlých sféroidech viditelných na fotografiích.

TCC má endokrinně-disruptivní účinky (Klímová, 2013). Podle studie Chen et al. (2008) samotný TCC nevykazuje téměř žádné účinky na samčí pohlavní žlázy, ale v kombinaci s testosteronem se ukazuje zesílení působení testosteronu, což mělo za následek v této studii zvětšení přídatných pohlavních orgánů. Podobný výsledek byl pozorován i *in vitro* (koncentrace 3,17 μM ; Chen et al., 2008). Totéž potvrdila i *in vitro* studie na buněčných liniích C4-2B a LNCaP, kdy AR byl aktivován TCC (koncentrace 1 μM) pouze za přítomnosti testosteronu nebo DHT (Rochester et al., 2017).

TCC je sledován jako prioritní látka z důvodu vysokého objemu produkce. Má podobné vlastnosti jako TCS a často ve vyskytují v životním prostředí společně. Ačkoli byl TCC používán dříve než TCS, je o něm dostupných mnohem méně informací a studií zaměřených pouze na TCC je poskrovnu

(Klímová, 2013). TCC díky svým antibakteriálním účinkům tvoří, stejně jako TCS, složku PCPs (např. zubní pasty, deodoranty, mýdla, krémy, čisticí prostředky), jejichž prostřednictvím jsou jím exponováni lidé. TCC je obsažen i v plastech, tvoří jednu ze složek zpomalovačů hoření (Chisten et al., 2010).

I TCC je odváděn odpadními vodami z domácností kvůli nadměrnému užívání PCPs, objevuje se tedy v životním prostředí a akumuluje se v rostlinách, jejichž konzumace může představovat zdroj TCC pro člověka. Byly analyzovány vzorky zeleniny pěstované na poli ošetřovaném biologickým pevným odpadem, který obsahoval i TCC, koncentrace TCC v rostlinách byla 5,7 ng/g sušiny. Na základě těchto výsledků je odhadováno, že konzumace takto ošetřené zeleniny představuje méně než 0,5 % ADI pro TCC, což je zanedbatelný příjem TCC člověkem (Prosser et al., 2013). TCC má schopnost se kumulovat také ve tkáních člověka, byl např. detekován v moči u více jak 36 % vzorků odebraných u lidí žijících v USA (Rochester et al., 2017). Také byla provedena studie výskytu TCC v moči matek, které ukazují expozici plodu této látky během těhotenství. Průměrná koncentrace TCC v moči matek byla 0,66 nM (Pycke et al., 2014).

3D model multicekulárních sféroidů byl použit k hodnocení čtyř chemických látek, z nichž tři se sledují v životním prostředí a mohou představovat možné riziko pro samčí reprodukci. MTX dle očekávání neprokázal přímé cytotoxické působení na Leydigovy TM3 buňky rostoucí v 3D struktuře, avšak způsoboval změnu velikosti a tvaru sféroidů Leydigových buněk, což může způsobovat riziko pro tyto buňky *in vivo* a ovlivňovat jejich nezbytnou funkci v testikulárním systému. Existují studie ukazující jeho možné negativní působení na testikulární systém prostřednictvím metabolitu HPTE, který nepříznivě ovlivňoval produkci testosteronu. Zároveň výskyt MTX v životním prostředí je v minimálních koncentracích (vody a půdy – pokud jde o Českou republiku), které neohrožují lidské zdraví. Stále se provádí analýzy potravin zkoumající zbytky MTX v potravinách nebo na plodinách (výskyt MTX je často sledován spolu s dalšími látkami v minulosti používanými jako organochlorové pesticidy), přičemž výskyt MTX je považován za nahodilý a dosti omezený a odhadovaná zátěž lidí je stabilně nízká. Jeho možný negativní vliv je však nutné brát do úvahy v souvislosti s ostatními látkami, zejména organochlorovanými pesticidy, spolu se kterými vyskytuje v prostředí ve směsi.

Dle výsledků ze studie Yawer et al. (v přípravě) na Leydigových TM3 buňkách rostoucích ve 2D modelu se předpokládalo cytotoxické působení TCS na Leydigovy buňky v koncentracích 40 μ M a výše, což se neprokázalo, jelikož TCS ve 3D modelu neovlivňoval významně velikost a tvar a měl mírně negativní vliv na životaschopnost menších sféroidů pouze ve 100 μ M. TCS je považován za možný endokrinní disruptor působící androgenně, ovšem v *in vivo* Hershbergerově testu byl negativní. TCS se v životním prostředí nevyskytuje ve vysokých koncentracích, ovšem člověk ho přijímá z mnoha různých zdrojů (TCS lze detekovat v lidské krvi, moči, tukových tkáních). Nejčastěji s ním do kontaktu člověk

přichází používáním PCPs, ale TCS se objevuje i ve vodě a výzkumy ukázaly jeho výskyt i v plodinách (příjem z půdy, zalévání nevyčištěnými vodami obsahujícími TCS). TCS má pravděpodobně schopnost bioakumulace.

Hodnocení testikulární toxicity TCC pomocí multicelulárních sféroidů Leydigových buněk prokázalo jeho cytotoxicitu (koncentrace 25 a 100 μM), což není ve shodě s výsledky ze 2D kultury. Studií zabývajících se působením TCC na testikulární buňky nebo sledující jeho vliv na samčí reprodukci je velmi málo. Obecně je TCC považován za možný endokrinní disruptor, který výrazně zesiluje působení testosteronu, což se projevuje zvětšením přídatných pohlavních žláz. V životním prostředí se často vyskytuje společně s TCS, člověk s ním tedy přijde do kontaktu nejčastěji používáním PCPs a též příjmem kontaminované vody. Stejně jako TCS má i TCC schopnost se akumulovat v tukových tkáních člověka a že je člověk TCC exponován dokazují studie, které ukazují obsah TCC v moči.

Aby bylo možné lépe posoudit vliv těchto látek na samčí reprodukci, je třeba k jejich hodnocení využít další dostupné 3D *in vitro* modely a dostupné testikulární buňky. V této práci se pomocí modelu multicelulárních sféroidů ukázal vliv látek na Leydigovy buňky, které však tvoří jen malou část komplexního systému varlat. Bylo by proto třeba ke sledování účinků látek využít model co nejvěrněji napodobující testikulární systém *in vivo*, kterému se v současnosti nejvíce přibližuje organoid nebo orgánový explantát ve spojení s mikrofluidním zařízením. Tyto modely tvořené v ideálním případě lidskými buňkami, často velmi špatně dostupnými, by mohly věrněji odrážet možné působení látek na vznik a produkci funkčních pohlavních buněk.

Závěr

Teoretická část pojednává o důležitosti 3D *in vitro* modelů v oblasti zkoumání testikulární toxicity látek. Trojrozměrná struktura testikulárních útvarů i orgánů je základním předpokladem pro napodobení situace *in vivo*, proto je důležité věnovat pozornost 3D modelům ke studiu testikulární toxicity a co nejvíce se přiblížit přirozeným podmínkám. Ve 3D systému jsou kultivované buňky vystaveny ze všech stran ostatním buňkám, se kterými jsou v úzkém kontaktu a navzájem spolu komunikují a interagují, nebo kultivačnímu médiu či extracelulární matrix. Obecně je možné 3D modely udržovat mnoho dní, někdy i měsíců, v porovnání se 2D modely, které se dají udržovat v řádu dní. Často jsou však 3D modely náročné na provedení i čas a problém představuje i špatná dostupnost požadovaných typů buněk, zejména lidských. Tato práce byla zaměřena hlavně na Leydigovy buňky produkující hlavní samčí androgen testosteron, které představují nenahraditelnou složku komplexního testikulárního systému. Lidské Leydigovy buňky je těžké získat a udržovat jejich markery funkčnosti při dlouhodobé kultivaci ve 2D modelu. I když jejich kultivace ve 3D modelech umožňuje dlouhodobější udržení jejich tvaru a funkčnosti, přesto neexistuje zatím moho studií, které by je využívaly při hodnocení testikulární toxicity látek.

V praktické části byl využit 3D *in vitro* model multicelulárních sféroidů tvořených Leydigovými TM3 buňkami k hodnocení testikulární toxicity vybraných environmentálně relevantních kontaminantů (herbicide methoxychlor, produkty osobní potřeby triklosan a triklokarban) s možným negativním účinkem na samčí reprodukci. Vliv látek byl hodnocen pomocí parametrů charakterizujících velikost, tvar a životaschopnost sféroidů. Toxicita těchto látek již byla zkoumána ve 2D uspořádání na Leydigových TM3 buňkách, proto tato práce mimo jiné porovnává působení látek ve 2D a 3D systému. Získané výsledky poskytují další informace o působení methoxychloru, triklosanu a triklokarbanu na Leydigovy buňky a také ukazují možnost využití 3D modelu multicelulárních sféroidů k hodnocení testikulární toxicity látek.

7. Seznam literatury

- Alimperti, S., Lei, P., Wen, Y., Tian, J., Campbell, A. M., Andreadis, S. T. (2014). Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnology progress*, 30(4), 974–983.
- Alves-Lopes, J. P., Söder, O., Stukenborg, J. (2017). Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system. *Biomaterials*, 130, 76–89.
- Akingbemi, B. T., Ge, R., Klinefelter, G. R., Gunsalus, G. L., Hardy, M. P. (2000). A Metabolite of methoxychlor, 2,2-Bis(*p*-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, reduces testosterone synthesis in rat Leydig cells through suppression of steady-state messenger ribonucleic acid levels of the cholesterol side-chain cleavage enzyme. *Biology of reproduction*, 62(3), 571–578.
- Auchus, R. J. (2004). The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(9), 432–438.
- Baek, N. Seo, O.W. Lee, J. Hulme, J., An, S. S. A. (2016). Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. *Dovepress*, 2016(10), 2155–2165.
- Baert, Y., De Kock, Y., Alves-Lopes J. P., Söder, O., Srukenborg, J., Grossens, E. (2017). Primary human testicular cells self-organize into organoids with testicular properties. *Stem Cell Reports*. 8(1), 30–38.
- Basu, A., Dydowiczova, A., Trosko, J. E., Blaha, L., Babica, P. Ready to go 3D? A simple protocol for automated high-throughput toxicity testing in 3D cell cultures, plánované pro *Scientific Reports*.
- Berthois, Y. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, B. S. (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(8), 2496–2500.
- Bilinska, B. (1989). Interaction between Leydig and Sertoli cells *in vitro*. *Cytobios*, 60(241). 115–126.
- Bilinska, B. Kotula-Balak, M. Sadowska, J. (2009). Morphology and function of human Leydig cells *in vitro*. Immunocytochemical and radioimmunological analyses. *European Journal of Histochemistry*, 53(1).
- Blažková, E. (2016). Dostupné *in vitro* modely ke studiu testikulární toxicity. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- Buah-Kwofie, A., Humphries, M. S., Pillay, L. (2018). Bioaccumulation and risk assessment of organochlorine pesticides in fish from a global biodiversity hotspot: Simangaliso Wetland Park, South Africa. *Science of the Total Environment*, 621, 273–281.
- Chapin, R. E., Boekelheide, K., Cortvriendt, R., Van Duursen, M. B. M., Gant, T., Jegou, B., Marczylo, E.,

- Van Pelt, A. M. M., Post, J. N., Roelfos, M. J. E., Schlatt, S., Teerds, K. J., Toppari, J., Piersma, A. H. (2013). Assuring safety without animal testing: the case for the human testis *in vitro*. *Reproductive Toxicology*, 39, 63–68.
- Chen, G. Ge, R. Lin, H. Dong, L. Sottas, Ch. M. Hardy, M. P. (2007). Development of a cryopreservation protocol for Leydig cell. *Human Reproduction*, 22(8), 2160–2168.
- Chen, H., Stanley, E., Jin, S., Zirkin, B. R. (2010). Stem Leydig cells: from fetal to aged animals. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 90(4), 272–283.
- Chen, H., Wang, Y., Ge, R., Zirkin, B. R. (2017). Leydig cell stem cells: identification, proliferation and differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 445, 65–73.
- Chen, J., Ahn, K. C., Gee, N. A., Ahmed, M. I., Duleba, A. J., Zhao, L., Gee, S. J., Hammock, B. D., Lasley, B. L. (2008). Triclocarban enhances testosterone action: a new type of endocrine disruptor? *Endocrinology*, 149(3), 1173–1179.
- Chen, L., Zhao, Y., Linchao, L., Lubin, X., Xianwu, C., Jianpeng, L., Xiaoheng, L., Jin, L., Xingwang, L., Ren-Shan, G. (2018). Bisphenol A stimulates differentiation of rat stem Leydig cells *in vivo* and *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology*,
- Christen, V., Crettaz, P., Oberli-Schrämmli, A., Fent, K. (2010). Some flame retardants and the antimicrobials triclosan and triclocarban enhance the androgenic activity *in vitro*. *Chemosphere*, 81(10), 1245–1252.
- Cimr, T. (2016). Hodnocení cytotoxicity v in vitro kulturách buněčných sféroidů. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- Cirelli, E. De Domenico, E. Botti, F. Massoud, R. Geremia, R. Grimaldi, P. (2017). Effect of microgravity on aromatase expression in Sertoli cells. *Scientific Reports*, 7, 3469.
- Clevers, H., Lancaster, M., Takebe, T. (2014). Advances in organoid technology. *Cell stem cell* 20. Dostupné z: < [https://www.cell.com/cell-stem-cell/pdf/S1934-5909\(17\)30179-0.pdf](https://www.cell.com/cell-stem-cell/pdf/S1934-5909(17)30179-0.pdf) .
- Cui, X. Hartando, Y. Zhang, H. (2017). Advances in multicellular spheroids formation. *The Royal Society Publishing Interface*, 14(127).
- Daston, G. P., Procter & Gamble (2007). Alternatives in reproductive toxicity: a way forward. Dostupné z: < <http://alttox.org/alternatives-in-reproductive-toxicity-a-way-forward/> >
- De Kock, J., Rodriguez, R. M., Bolleyn, J., Vanhaecke, T., Focus on stem cells as sources of human target cells for *in vitro* research and testing. *Altex*. Dostupné z: < www.altex.ch/resources/541548_DeKock221.pdf >
- Doherty C. M., Clark M. M. (2006). Léčba neplodnosti. Computer Press, Brno.
- Engeli, R. T., Fürstenberger, C., Kratschmar, D. V., Alex, O. (2018). Currently available murine Leydig cell lines can be applied to study early steps of steroidogenesis but not testosterone synthesis. *Heliyon*, 4.

- Farmer, W. T. Louis, G. W., Buckalew, A. R., Hallinger, D. R., Stocker, T. E. (2018). Evaluation of triclosan in the Hershberger and H295R steroidogenesis assays. *Toxicology letters*, 291, 194–199.
- Forgacs, A.L., Ding, Q., Jaremba, R. G., Huhtaniemi, I. T., Rahman, N. A., Zacharewski, T. R. (2012). BLTK1 murine Leydig cells: a novel steroidogenic model for evaluating the effects of reproductive and developmental toxicants. *Toxicological sciences*, 127(2), 391–402.
- Freedman, B. S., Brooks, C. R., Lam, A. Q., Fu, H., Morizane, R., Agrawal, V., Saad, A. F., Li, M. K., Hughes, M. R., Werff, R. V., Peters, D. T., Lu, J., Baccei, A., Siedlecki, A. M., Valerius, M. T., Musunuru, K., McNagny, K. M., Steinman, T. I., Zhou, J., Lerou, P. H., Bonventre, J. V. (2015). Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature Communications*, 6, 8715.
- Goncalves, G. D. Semprebon, S. C. Biazzi, B. I. Matovani, M. S. Fernandes, G. S. A. (2018). Bisphenol A reduces testosterone production in TM3 Leydig cells independently of its effects on cell death and mitochondrial membrane potential. *Reproductive Toxicology*, 76, 26–34.
- Gondo, S., Okabe, T., Tanaka, T., Morinaga, H., Nomura, M., Takayanagi, R., Nawata, H., Yanase, T. (2008). Adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal cells develop into different lineage of steroidogenic cells by forced expression of steroidogenic factor 1. *Endocrinology*, 149(9), 4717–4725.
- Hamidabadi, H. Bojnordi, M. N. (2017). Co-culture of mouse spermatogonial stem cells with sertoli cell as a feeder layer, stimulates the proliferation and spermatogonial stemness profile. *Middle East Fertility Society Journal*, 16, Unit–16.10.
- Hareng, L. Bremer, S. Pellizzer, C. Schwarz, M. Hartung, T. (2005). The Integrated Project ReProTect: A novel approach in reproductive toxicity hazard assessment. *Reproductive Toxicology*, 20(3), 441–452.
- Harris, S., Hermsen, S. A., Yu, X., Hong, S. W., Faustman, E. M. (2015). Comparison of toxicogenomic responses to phthalate ester exposure in an organotypic testis co-culture model and responses observed *in vivo*. *Reproductive toxicology*, 58, 149–159.
- Harris, S., Wegner, S., Hong, S. W., Faustman, E. M. (2016). Phthalate metabolism and kinetics in an *in vitro* model of testis development. *Toxicology in vitro*, 32, 123–131.
- Haycock, J. (2011). 3D cell culture: methods and protocols. Humana Press, New York.
- Holoubek, I., Čupr, P., Klánová, J., Zbírál, J., Vácha, R., Kužílek, V., Rieder, M. (2006). Zhodnocení výskytu POPs pesticidů dle Stockholmské úmluvy v POPs protokolu úmluvy a přeshraničním transportu látek znečišťujících ovzduší v agroekosystému ČR. Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí.
- Jurewicz, J., Radwan, M., Wielgomas, B., Kałużny, P., Klimowska, A., Radwan, P., Hanke, W. (2018).

- Environmental levels of triclosan and male fertility. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6), 5484–5490.
- Komeya, M., Hayashi, K., Nakamura, H., Yamanaka, H., Sanjo, H., Kojima, K., Sato, T., Yao, M., Kimura, H., Fujii, T., Ogawa, T. (2017). System driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis *in vitro*. *Scientific reports*, 7, 15459 (číslo článku).
- Kubincová, P., Novák, J., Sovadinová, I. (2016). Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické Listy*, 110 (2), 118–125.
- Kumar, V., Chakraborty, A., Kural, M. R., Roy, P. (2009). Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reproductive toxicology*, 27(2), 177–185.
- Landreh, L. 2014. Identification and charakterizatin of stem Leydig cells in the testis. The department of women's and children's health, Karolinska institutet.
- Dostupné z: < https://openarchive.ki.se/xmlui/.../Thesis_Luise_Landreh.pdf >
- Langmeier, M., Kittnar, O., Marešová, D., pokorný, J. (2009). Základy lékařské fyziologie. Grada, Praha.
- Legendre, A. Froment, P. Desmots, S. Lecomte, A. Habert, R. Lemazurier, E. (2010). An engineered 3D blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential. *Biomaterials*, 31(16), 4492–4505.
- Liebert, M. A. (2017). Stem Cells and Development. Volume 27.
- Online ISSN: 1557-8534
- Mäkelä, J., Toppari, J., Rivero-Müller, A., Ventela, S. (2014). Reconstruction of Mouse Testicular Cellular Microenvironments in Long-Term Seminiferous Tubule Culture. Plos.
- Mather, J. P., Zhuang, L., Perez-Infante, V., Phillips, D. M. (1982). Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium. *Annals of the New York Academy of sciences*, 383(1).
- McDowell, E. N., Kisielevski, A. E., Pike, J. W., Franco, H. L., Yao, H. H., Johnson, K. J. (2012). A Transcriptome-wide screen for mRNAs enriched in fetal Leydig cells: CRHR1 agonism stimulates rat and mouse fetal testis steroidogenesis. Plos.
- Méchali, M., Méchali, F., Lavkey R. A. (1983). Tumor promoter TPA increases initiation of replication on DNA injected into xenopus eggs. *Cell*, 35(1), 63–69.
- Michalová, J., Stehnová, M. Odstraňování pesticidních látek na úpravně vody Václaví. Severočeské vodovody a kanalizace, a.s.
- Dostupné z: < www.smv.cz/index.php?cmd=document&id=903 >
- Mohammed, M., Boateng, K. (2017). Evaluation of pesticide residues in tomato (*Lycopersicum esculentum*) and the potential health risk to consumers in urban areas of Ghana. *Pollution*, 8(3), 69–80.

- Murono, E. P., Derk, R. C. (2004). The effects of the reported active metabolite of methoxychlor, 2,2-bis(*p*-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, on testosterone formation by cultured Leydig cells from young adult rats. *Reproductive toxicology*, 19(1), 135–146.
- Musilová, V. 2017. Hepatotoxické a hepatokarcinogenní účinky chemických látek v kulturách buněčných sféroidů. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Brno.
- National Research Council (2007). Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nature methods, 2018. Method of the Year 2017: organoids. 15(1)
- OECD/OCDE. (2014). Guideline for testing of chemicals, 422.
- Odeh, H. M., Kleinguetl, C., Ge, R., Zirkin, B. R., Chen, H. (2014). Regulation of the proliferation and differentiation of Leydig stem cells in the adult testis. *Biology of Reproduction*, 90(6), 123.
- Olaniyan, L. W. B., Mkwetshana, N., Okoh, A. I. (2016). Triclosan in water, implications for human and environmental health. *Springerplus*, 5(1), 1639
- Page, H., Flood, P., Reynaud, E. G. (2013). Three-dimensional tissue cultures: current Trends and Beyond. *Cell and Tissue Research*, 325(1), 123–131.
- Peak, T. C., Haney, N. M., Wang, W., DeLay, K. J., Hellstrom, W. J. (2016). Stems cell therapy for the treatment of Leydig cell dysfunction in primary hypogonadism. *World Journal of Stem Cells*, 8(10), 306–315.
- Pernoncini, K. V., Montagini, B. G., de Góes, M. L. M., Garcia, P. C., Gerardin, D. C. C. (2018). Evaluation of reproductive toxicity in rats treated with triclosan. *Reproductive toxicology*, 75, 65–72.
- Pěkníková, J. (2007). Vliv endokrinních disruptorů na fertilitu samců. *Urologické listy*, 5(3), 6–10.
- Dostupné z: < http://www.prolekare.cz/pdf?ida=ul_07_03_02.pdf >.
- Plant, T. M., Zeleznik A. J., Albertini, D. F., Goodman, R. L., Herbison A. E., McCarthy M. M., Muglia L. J., Richards J. S. (2015). Knobil and Neill's physiology of reproduction. *Academic Press*.
- Procházková, L., Kosour, D., Lošťáková, Z., Baránek, V., Geriš, R., Jahodová, D., Husák, V. (2012). Souhrnná zpráva ve vývoji jakosti povrchových vod v povodí Moravy ve dvouletí 2010–2011. Dostupné z: < www.pmo.cz/download/zprava-2010-2011.pdf >.
- Prosser, R. S., Lissemore, L., Topp, E., Sibley, P. K. (2013). Bioaccumulation of triclosan and triclocarban in plants grown in soils amended with municipal dewatered biosolids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(5), 975–984.
- Pycke, B. F. G., Geer, L. A., Dalloul, M., Abulafaia, O., Jenck, A. M., Halden, R. U. (2014). Human fetal exposure to triclosan and triclocarban in an urban population from Brooklyn, New York. *Environmental science & technology*, 48(15), 8831–8838.
- Reis, M. M. S., Moreira, A. C., Sousa, M., Mathur, P. P., Oliveira, P. F., Alves, M. G. (2015). Sertoli cell as

- a model in male reproductive toxicology: advantages and disadvantages. *Journal of Applied Toxicology*, 35(8), 870–883.
- Rochester, J. R., Bolden, A. L., Pelch, K. E., Kwiatkowski, C. F. (2017). Potential developmental and reproductive impacts of triclocarban: a scoping review. *Journal of Toxicology*. 15 stran.
- Rouiller-Fabre, V., Lecref, L., Gautier, C., Saez, J. M., Habert, R. (1998). Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology*, 139(6), 2926–34.
- Ruprich, J. (2009). Methoxychlor. IV Dietární expozice člověka. CHEMON, SZÚ.
Dostupné z: < czvp.szu.cz/monitor/tds11c/5CHEMON/ORG11/METOXY.pdf >
- Sadri-Ardekani, H., Pendergraft, S. S., Reid, T., Atala, A., Bishop, C. E. (2015). Multicellular Human Testicular Organoid: A Novel 3D In Vitro Germ Cell and Testicular Toxicity Model. *International Journal of Fertility & Sterility*, 9(1), 10–11.
- Saldutti, L. P., Beyer, B. K., Breslin, W., Brown, T. R., Chapin, R. E., Campion, S., Enright, B., Faustman, E., Foster, P. M. D., Hartung, T., Kelce, W., Kim, J. H., Lobo, E. G., Piersma, A. H., Seyler, D., Turner, K. J., Yu, H., Yu, X., Sasaki, J. (2013). In vitro testicular toxicity models: opportunities for advancement via biomedical engineering techniques. *Altex*, 30(3), 353–377.
- Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y., Ogawa, T. (2011). *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, 471(7339), 504–507.
- Sato, T., Katagiri, K., Kojima, K., Komeya, M., Yao, M., Ogawa, T. (2015). *In Vitro* spermatogenesis in explanted adult mouse testis tissues. Plos.
- Sasaki, J. C., Chapin, R. E., Hall, D. G., Breslin, W., Moffit, J., Saldutti, L., Enright, B., Seger, M., Jarvi, K., Hixon, M., Mitchard, T., Kim, J. H. (2011). Incidence and nature of testicular toxicity findings in pharmaceutical development. *Part B: Developmental & Reproductive Toxicology*, 92(6), 511–525.
- Shima, Y., Morohashi, K. (2017). Leydig progenitor cells in fetal testis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 445, 55–64.
- Simian, M., Bissel, M. J. (2016). Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. *The Journal Cell biology*.
- Sonoyama, T., Sone, M., Honda, K., Taura, D., Kojima, K., Inzuka, M., Kanamoto, N., Tamura, N., Nakao, K. (2012) Differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells into steroid-producing cells. *Endocrinology*, 153(9), 4336–4345.
- Stanley, E. L., Johnston, D. S., Fan, J., Papadopoulos, V., Chen, Ge, R., Zirkin, B. R., Jelinsky, S. A. (2011). Stem Leydig cell differentiation: gene expression during development of the adult rat population of Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 85, 1161–1166.

- Svechnikov, K., Landreh, L., Weisser, J., Izzo, G., Colón, E., Svechnikova, I., Söder, O. (2010). Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Hormone Research in Paediatrics*, 73, 93–101.
- Tilcz, J. B., Abbaci, M., Bastogne, T., Blondel, W., Dumas, D., Barberi-Heyob, M. (2013). System identification of the fluorescence recovery after photobleaching in gap junctional intracellular communications. *IEEE Xplore*.
- Vanetti, C., Bifari, F., Vicentini, L. M., Cattaneo, M. G. (2017). Fatty acids rather than hormones restore *in vitro* angiogenesis in human male and female endothelial cells cultured in charcoal-stripped serum. *Plos*.
- Váňová, S. (2016). Dospělé jaterní kmenové buňky a jejich využití v toxikologii. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- Wang, C., Tian, Y. (2015). Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental pollution*, 206, 195–201.
- Wegner, S. Hong, S. Yu, X. Faustman, E.M. (2013). Preparation of Rodent Testis Co-Cultures. *Current Protocols in Toxicology*, 55(1), 16.10.1–16.10.7.
- Welsh T. H., Jones, P. B. C., Hsueh, A. J. W. (1948). Phorbol Ester Inhibition of Ovarian and Testicular Steroidogenesis *in Vitro*. *Cancer Research*, 44(3), 885–892.
- Wen, Q., Cheng, C. Y., Liu, Y. (2016). Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in Cells & Developmental Biology*, 59, 89–98.
- Węsierska-Gądek, J., Schreiner, T., Maurer, M., Waringer, A., Ranftler, C. (2007). Phenol red in the culture medium strongly affects the susceptibility of human MCF-7 cells to roscovitine. *Cellular & molecular biology letters*, 12(2), 280-293.
- Yang, Y. Li, Z. Wu, X. Chen, H. Xu, W. Xiang, Q. Zhang, Q. Chen, J. Ge, R. Su, Z. Huang, Y. (2017). Direct reprogramming of mouse fibroblasts toward Leydig-like cells by defined factors. *Stem Cells Reports*, 8(1), 39–53.
- Yawer, A., Sychrová, E., Macíková, P., Raška, J., Babica, P., Sovadinová, I. The effect of environmental contaminants on Leydig cells: the role of gap junction intercellular communication, plánované do *Toxicology Letters*.
- Yazawa, T. Mizutani, T. Yamada, K. Kawata, H. Sekiguchi, T. Yoshino, M. Kajatani, T. Shou, Z. Umezawa, A. Miyamoto, K. (2006). Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology* 147(7), 4104–4111.
- Yin, L. Wei, H. Liang, S. Yu, X. (2017). From the cover: an animal-free *in vitro* three-dimensional testicular cell coculture model for evaluating male reproductive toxicants. *Toxicological sciences*, 159(2), 307–326.
- Yokonishi, T., Sato, T., Katagiri, K., Komeya, M., Kubota, Y., Ogawa, T. (2013). *In vitro* reconstruction

- of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation. *Biology of Reproduction*, 89(1), 15.
- Yu, X., Hong, S., Moreira, E. G., Faustman, E. M. (2009). Improving in vitro Sertoli cell/gonocyte co-culture model for assessing male reproductive toxicity: Lessons learned from comparisons of cytotoxicity versus genomic responses to phthalates. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239(3), 325–336.
- Zirkin, B. R. Papadopoulos, V. Hardy, M. P. (2010). Chapter 3 – Leydig cell development and function. Cambridge University Press, 29–47.
- Zhang, L. Chen, M. Wen, Q. Li, Y. Wang, Y. Wang, Y. Qin, Y. Cui, X. Yang, L. Huff, V. Gao, F. (2015). Reprogramming of Sertoli cells to fetal-like Leydig cells by *Wt1* ablation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(13), 4003–4008.
- Zhang, X. Zhu, Y. Tian, Y. Yan, H. Ren, L. Shi, W. Zhu, J. Zhang, T. (2018). The application of the improved 3D rat testicular cells co-culture model on the *in vitro* toxicity research of HZ1006. *Drug and Chemical Toxicology*, 23, 1–10.
- Zhang, Y., Ge, R., Hardy, M. P. (2008). Androgen-forming stem Leydig cells: identification, function and therapeutic potential. *Disease markers*, 24(4–5), 277–286.

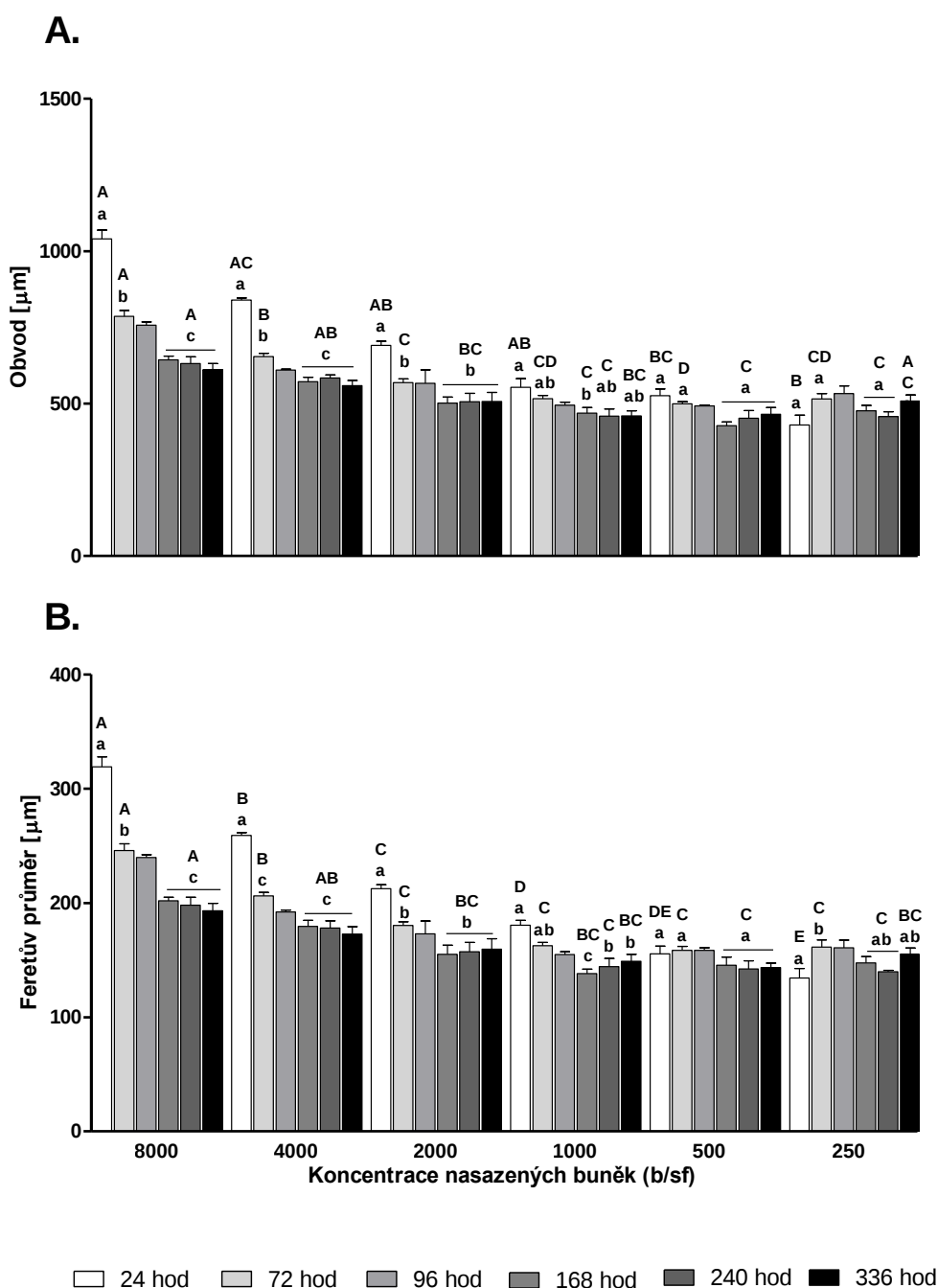
Internetové zdroje:

- www.alttox.org, (2007). [cit. 19. 5. 2016]. Dostupné z: < <http://alttox.org/mapp/toxicity-endpoints-tests/organ-toxicity/> >
- www.archive.epa.gov, [cit. 1. 5. 2018]. Dostupné z: < https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/methoxychlor_red.html >
- www.ec.europa.eu, [cit. 15. 5. 2018]. Dostupné z: < <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN&pestResidueId=158> >
- www.canvas.instructure.com, [cit. 15. 5. 2018]. Dostupné z: < <https://canvas.instructure.com/courses/1021937/pages/spermatogenesis> >
- www.chemportal.cz, [cit. 28. 2. 2016]. Dostupné z: < <http://www.chemportal.cz/evropska-legislativa-co-je-to-reach> >
- www.microtissues.com, [cit. 19. 5. 2016]. Dostupné z: < www.microtissues.com >
- www.oncohemakey.com, [cit. 15. 5. 2018]. Dostupné z: < <https://oncohemakey.com/functional-morphology-of-the-testis/> >
- www.sigmaaldrich.com, [cit. 14. 5. 2018]. Dostupné z: < <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture/3d-organoid-culture.html> >

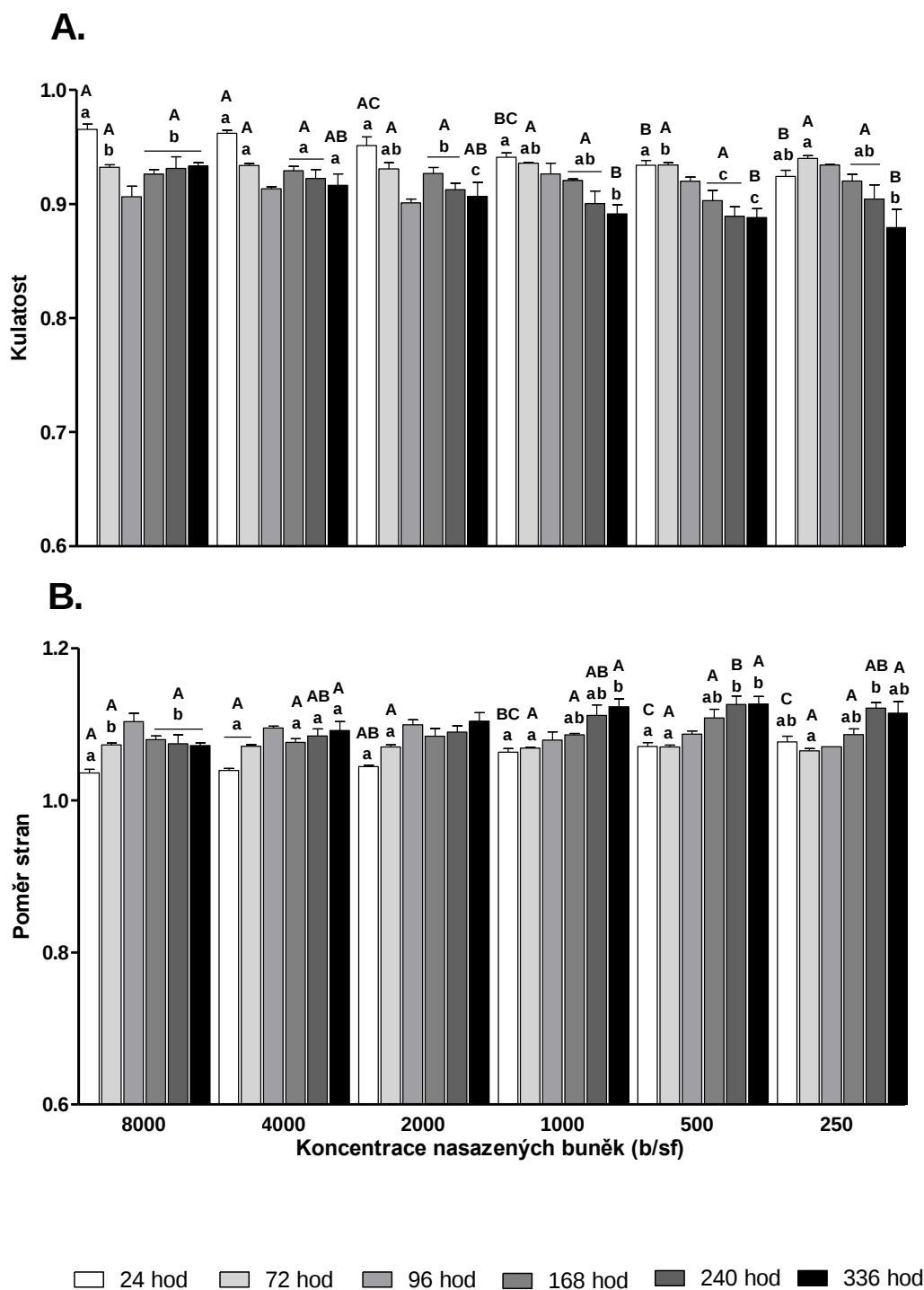
Stárka, L. (2010). Klinická andrologie I. Díl: Fyziologie a patofyziologie testikulární funkce. Dostupné z:
< www.cssmweb.cz/news/klinicka-andrologie-i-dil-starka-l-fyziologie-a-patofyziologie-testikularni-funkce/ >

8. Přílohy

Příloha 1

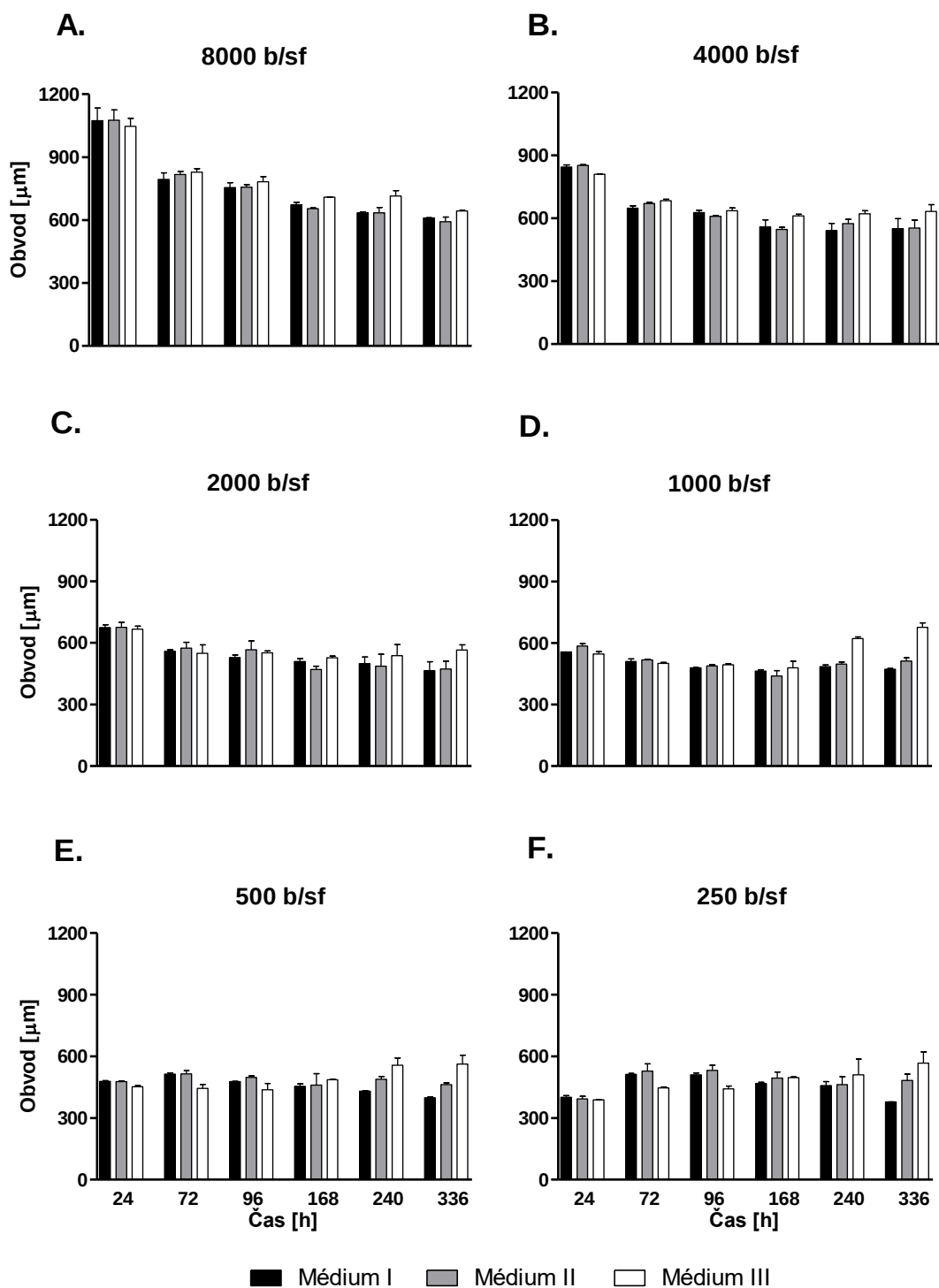


Obrázek 36: Vliv počtu nasazených Leydigových TM3 buněk a doby kultivace na velikost sféroidů. Velikost sféroidů je charakterizována obvodem (A.) a Feretovým průměrem (B.). Koncentrace nasazených buněk: 8000–250 b/sf, fotodokumentace probíhala 24, 72, 96, 168, 240 a 336 hod od nasazení buněk. Data jsou zobrazena jako průměr nezávislých experimentů $\pm$ SEM ($n = 4$; $n = 2$ pro čas 96 hod). Statisticky významná odlišnost ($P < 0,05$; one-way ANOVA s Tukeyovým post hoc testem nebo Kruskal-Wallis test s Dunnovým post hoc testem) mezi různými koncentracemi nasazených buněk v daném čase je vyjádřena odlišným velkým písmenem a mezi různými kultivačními časy pro danou koncentraci nasazených buněk odlišným malým písmenem. Čas 96 hod nebyl do statistického hodnocení zahrnut, jelikož byl nezávisle opakován pouze dvakrát.

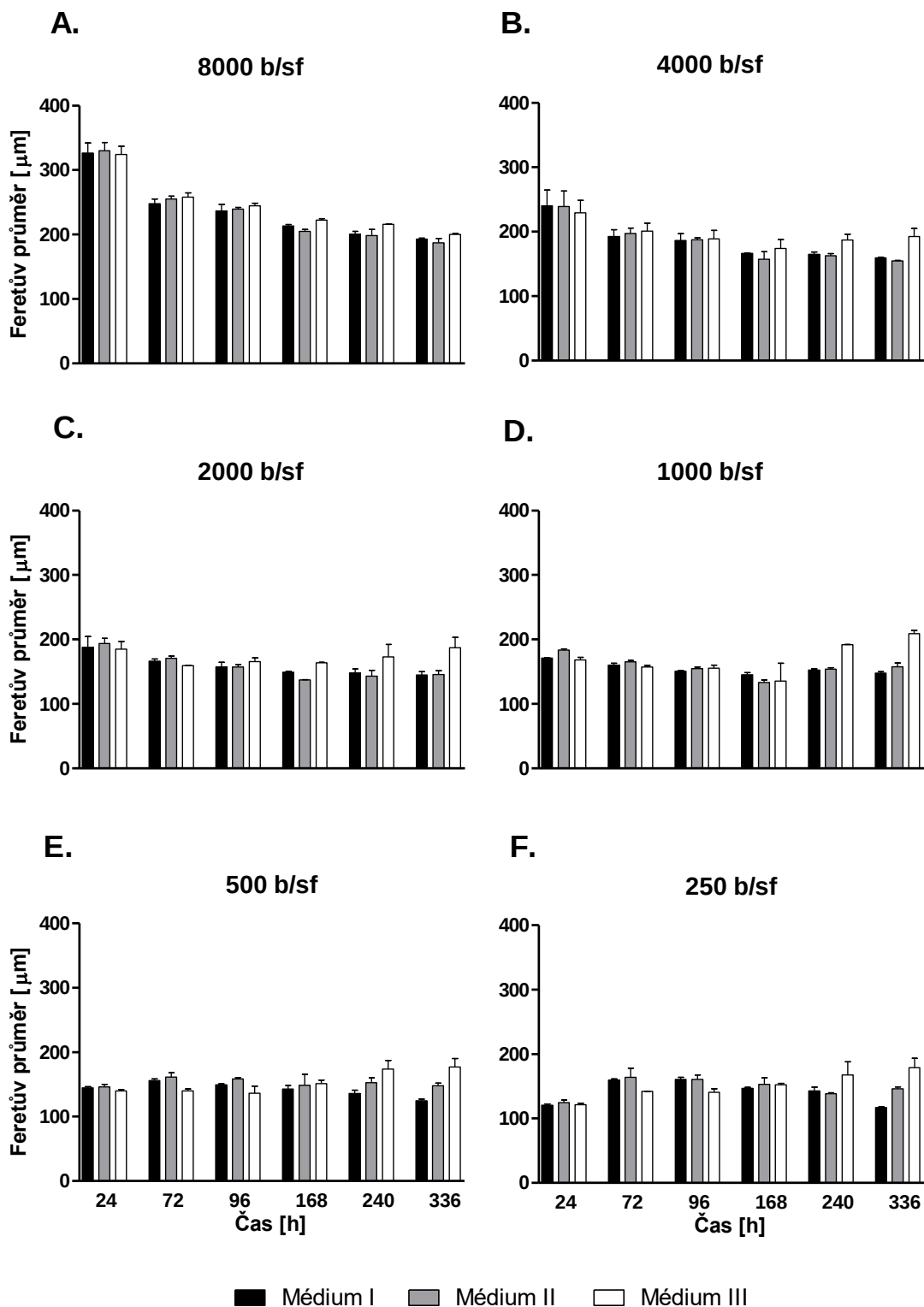


Obrázek 37: Vliv počtu nasazených Leydigových TM3 buněk a doby kultivace na tvar sféroidů. Tvar sféroidů je charakterizován kulatostí (A.) a poměrem stran (B.). Koncentrace nasazených buněk: 8000–250 b/sf, fotodokumentace probíhala 24, 72, 96, 168, 240 a 336 hod od nasazení buněk. Data jsou zobrazena jako průměr nezávislých experimentů $\pm$ SEM ($n = 4$; $n = 2$ pro čas 96 hod). Statisticky významná odlišnost ($P < 0,05$; one-way ANOVA s Tukeyovým post hoc testem nebo Kruskal-Wallis test s Dunnovým post hoc testem) mezi různými koncentracemi nasazených buněk v daném čase je vyjádřena odlišným velkým písmenem a mezi různými kultivačními časy pro danou koncentraci nasazených buněk odlišným malým písmenem. Čas 96 hod nebyl do statistického hodnocení zahrnut, jelikož byl nezávisle opakován pouze dvakrát.

Příloha 2

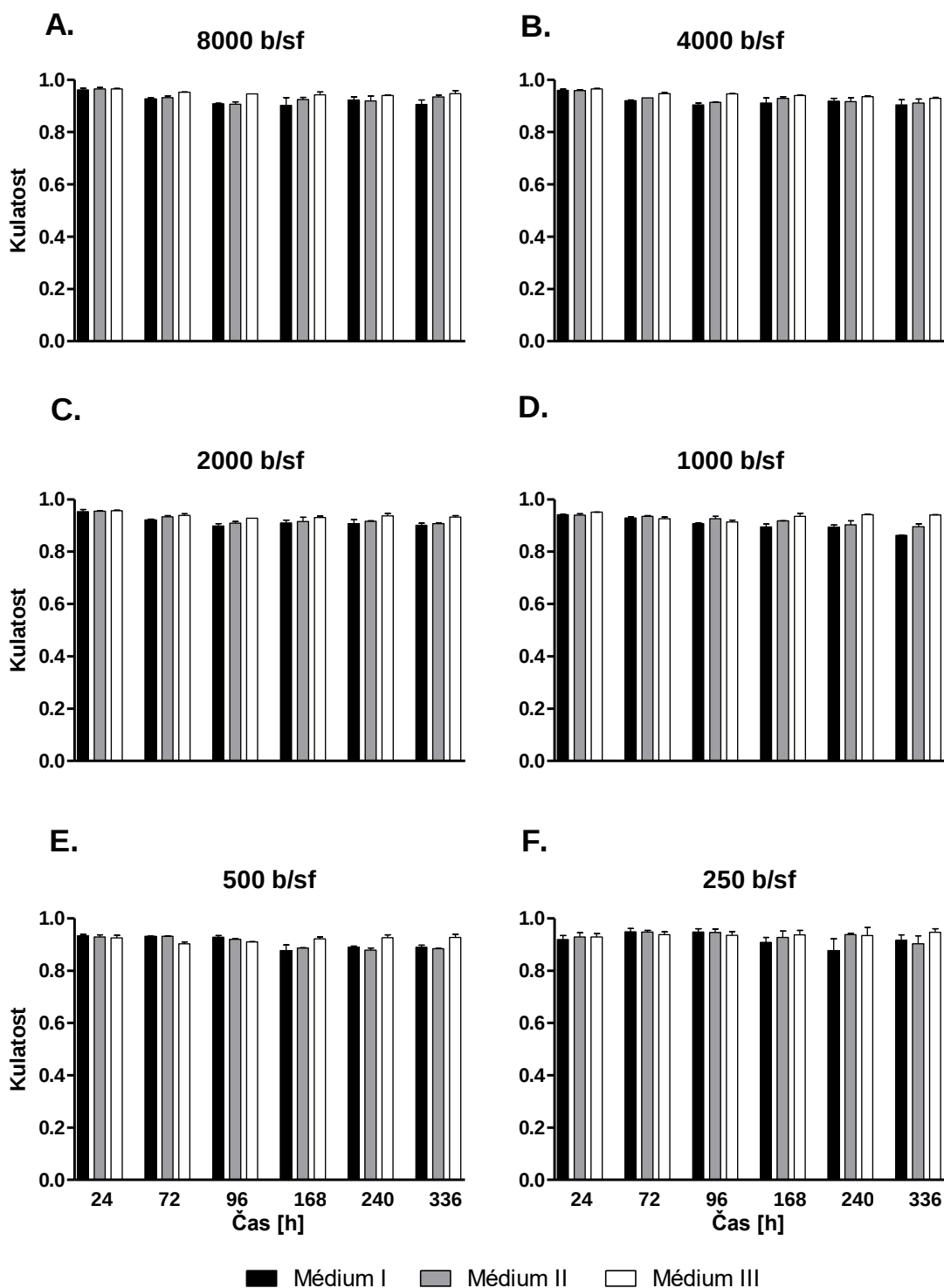


Obrázek 38: Vliv složení kultivačního média na velikost (obvod) sféroidů Leydigových TM3 buněk. Data jsou vyjádřena jako medián průměr $\pm$ SEM ($n = 2$) nezávislých experimentů. Koncentrace nasazených buněk: 8000, 4000, 2000, 1000, 500 a 250 b/sf. Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium III: médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)).



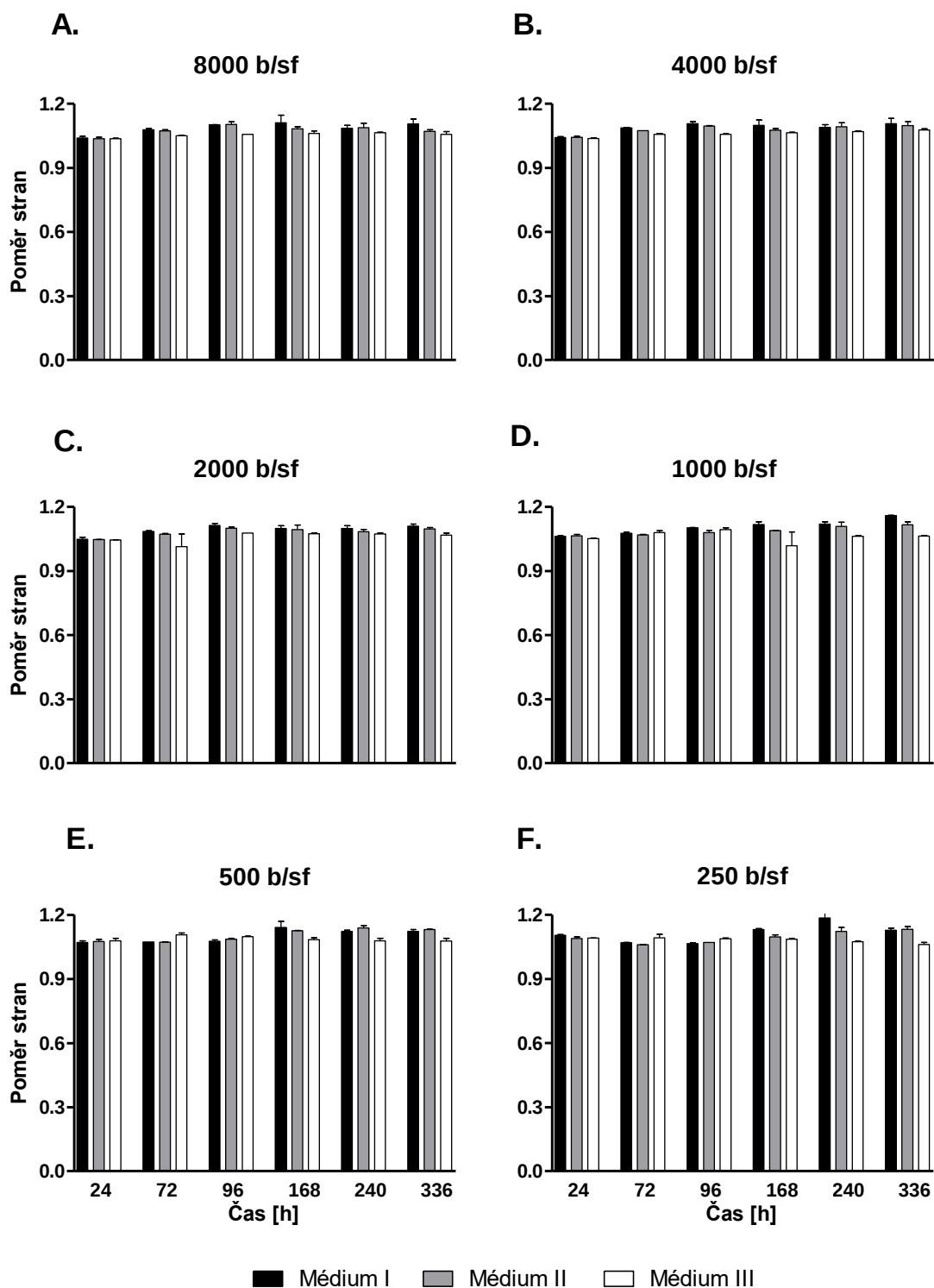
Obrázek 39: Vliv složení kultivačního média na velikost (Feretův průměr) sféroidů Leydigových TM3 buněk. Data jsou vyjádřena jako medián průměr $\pm$ SEM ($n = 2$) nezávislých experimentů. Koncentrace nasazených buněk: 8000, 4000, 2000, 1000, 500 a 250 b/sf. Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 μ g/ml)).

Médium III: médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)).



Obrázek 40: Vliv složení kultivačního média na tvar (kulatost) sféroidů Leydigových TM3 buněk. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ SEM ($n = 2$) nezávislých experimentů. Koncentrace nasazených buněk: 8000, 4000, 2000, 1000, 500 a 250 b/sf. Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)). Médium III: médium

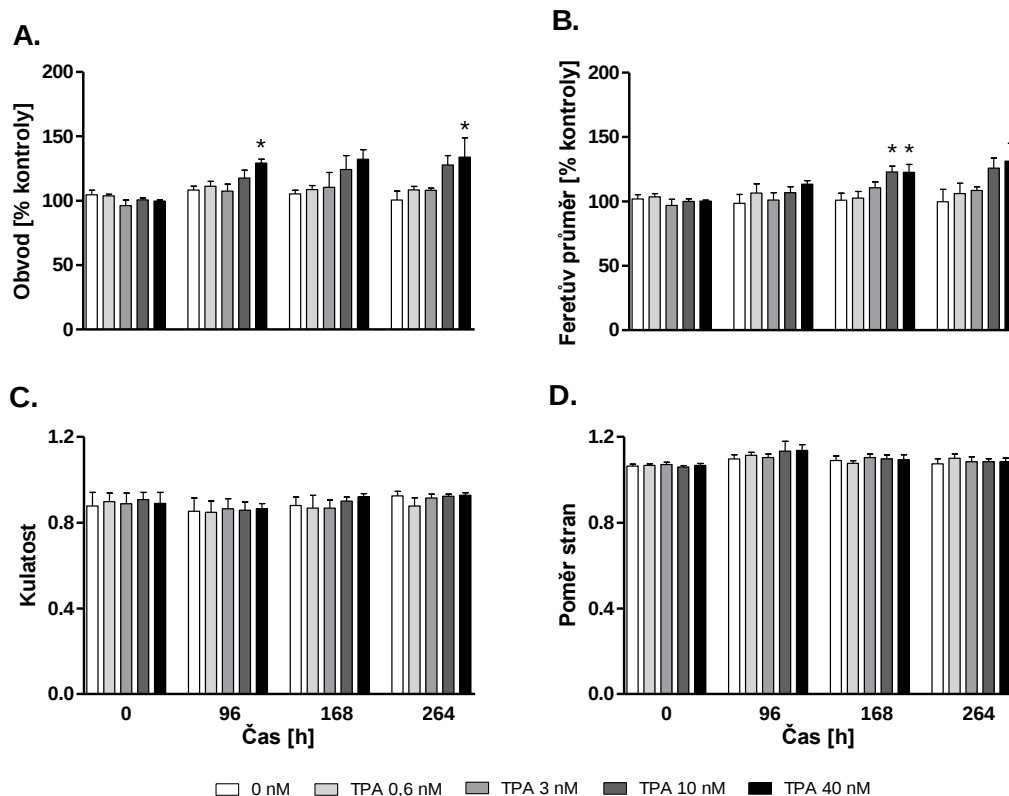
bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)).



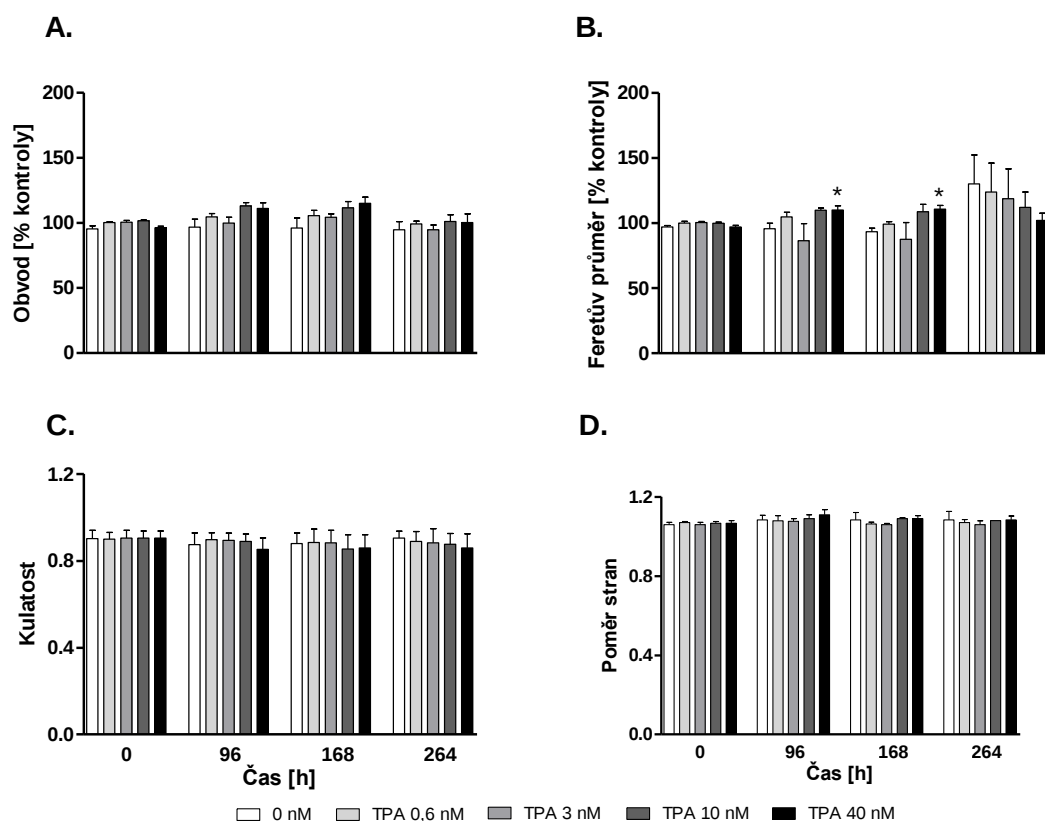
Obrázek 41: Vliv složení kultivačního média na tvar (poměr stran) sféroidů Leydigových TM3 buněk. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM (n = 2) nezávislých experimentů. Koncentrace nasazených buněk: 8000, 4000, 2000, 1000, 500 a 250 b/sf. Médium I: kompletní kultivační médium s fenolovou červení (DMEM/F12 red; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)). Médium II: kompletní kultivační médium bez fenolové červeně (DMEM/F12 white; 5% HS; 2,5% FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)). Médium III:

médium bez fenolové červeně a se sníženým obsahem hormonů (DMEM/F12 white; 7,5% DCT FBS; 2,5 mM L-glutamin; Normocin (100 µg/ml)).

Příloha 3

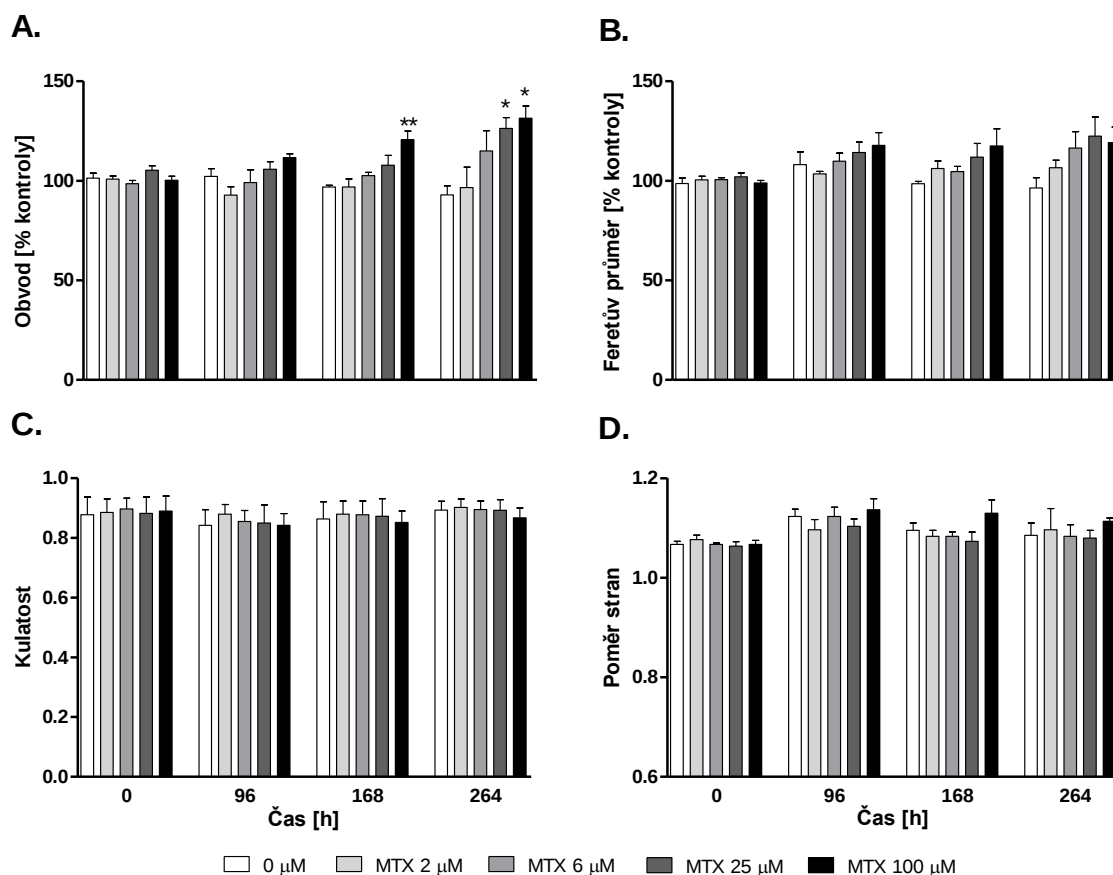


Obrázek 42: Vliv TPA na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf, koncentrace TPA: 0,6; 3; 10 a 40 nM, délka expozice: 0–264 hod. Obvod (**A.**) a Feretův průměr sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kulatost (**C.**) a poměr stran sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování $\pm$ SEM ($n = 4$). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$).

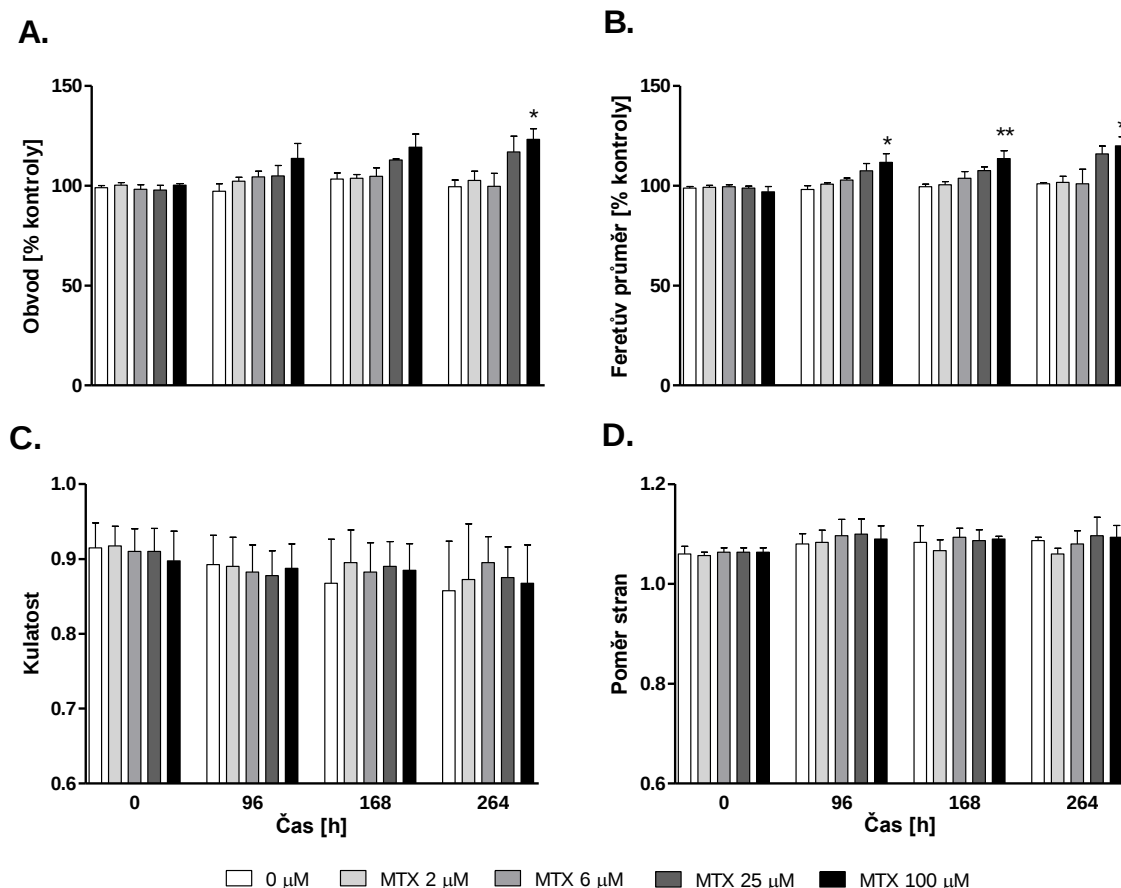


Obrázek 43: Vliv TPA na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf, koncentrace TPA: 0,6; 3; 10 a 40 nM, délka expozice: 0–264 hod. Obvod (A.) a Feretův průměr sféroidů (B.) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kulatost (C.) a poměr stran sféroidu (D.) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování $\pm$ SEM ($n = 4$). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$).

Příloha 4

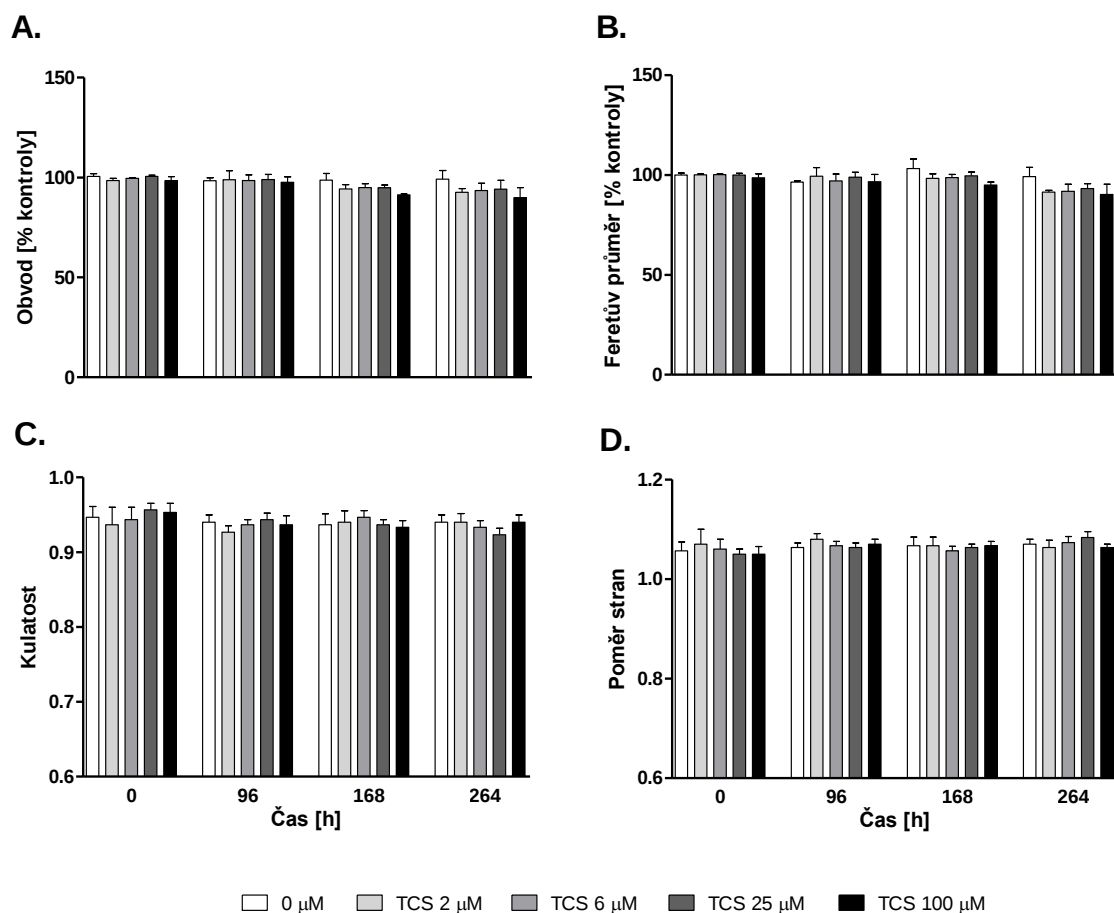


Obrazek 44: Vliv MTX na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf, koncentrace MTX: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Obvod (**A.**) a Feretův průměr sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kulatost (**C.**) a poměr stran sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 4). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01; ***, P ≤ 0,001).

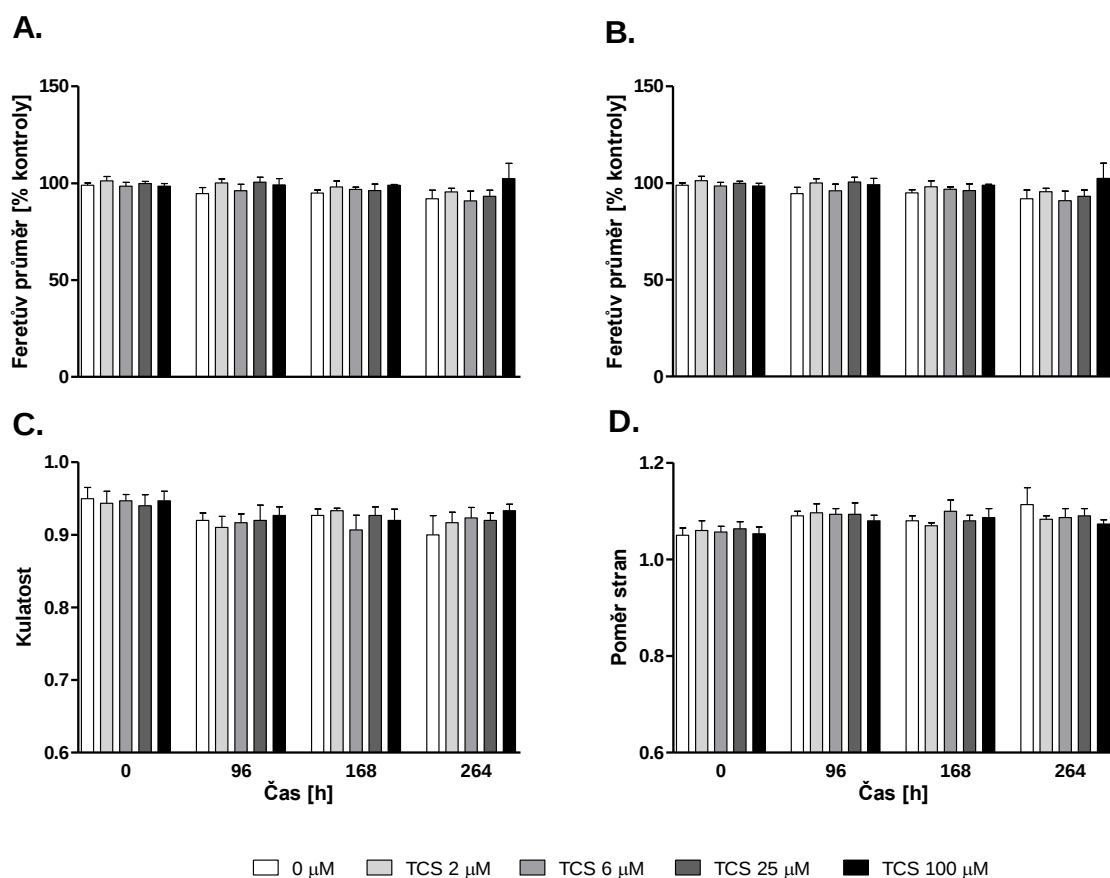


Obrázek 45: Vliv MTX na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf, koncentrace MTX: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Obvod (A.) a Feretův průměr sféroidů (B.) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kulatost (C.) a poměr stran sféroidu (D.) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 4). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$).

Příloha 5

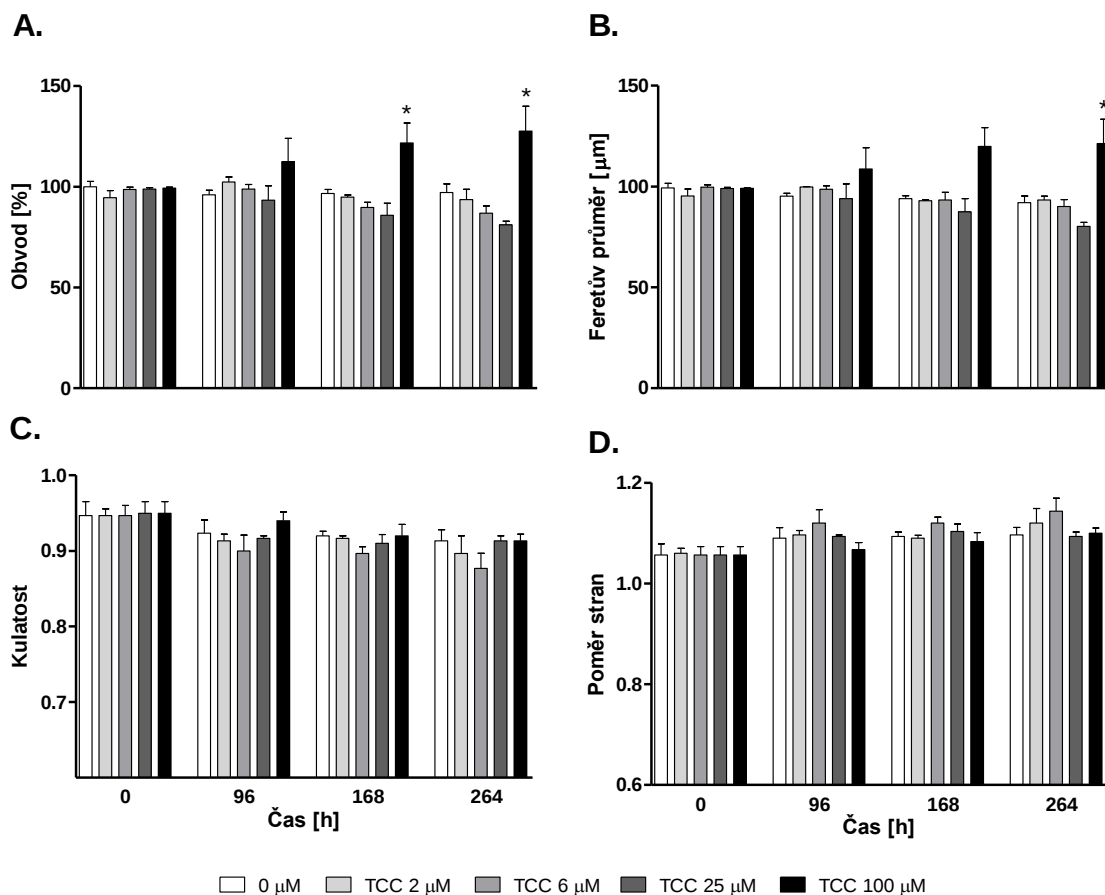


Obrázek 46: Vliv TCS na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf, koncentrace TCS: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Obvod (**A.**) a Feretův průměr sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kulatost (**C.**) a poměr stran sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 3). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01; ***, P ≤ 0,001).

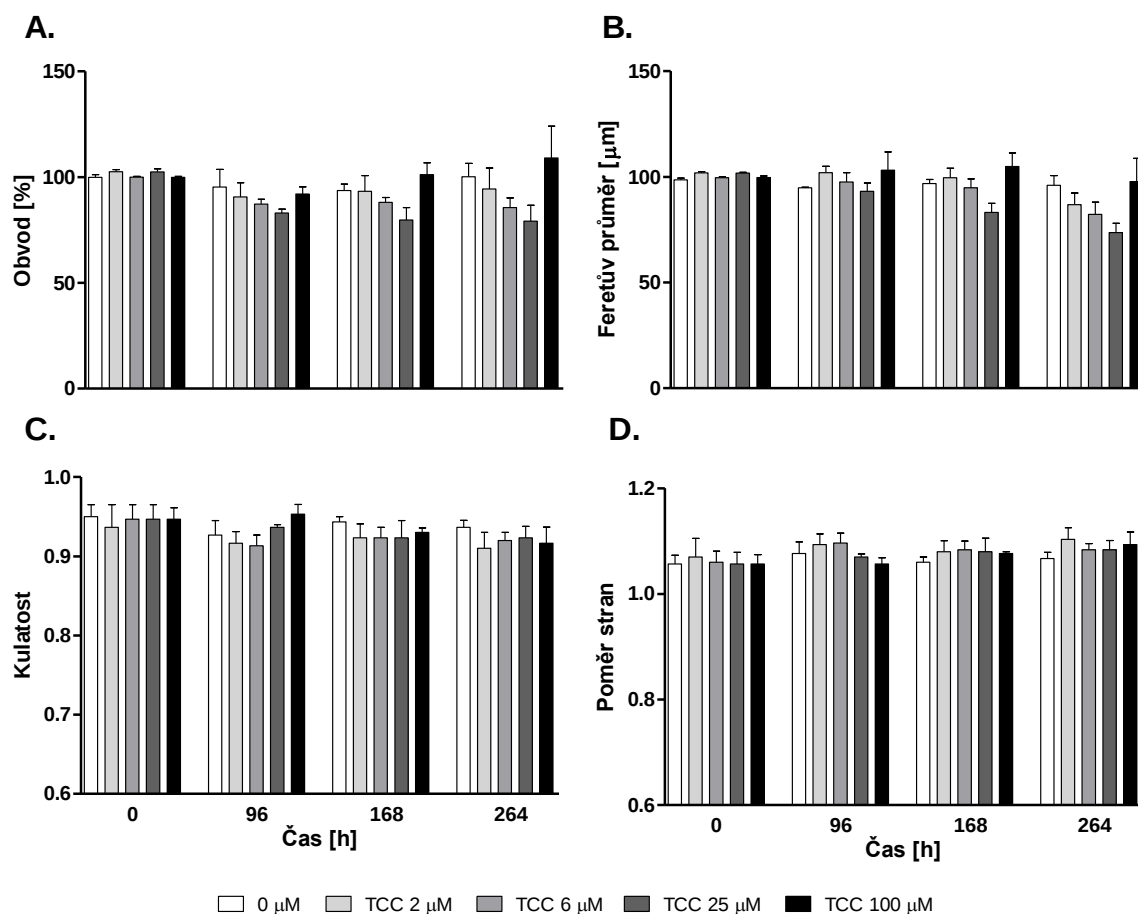


Obrázek 47: Vliv TCS na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf, koncentrace TCS: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Obvod (**A.**) a Feretiv průměr sféroidů (**B.**) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kulatost (**C.**) a poměr stran sféroidu (**D.**) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 3). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01; ***, P ≤ 0,001).

Příloha 6



Obrázek 48: Vliv TCC na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (1000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 1000 b/sf, koncentrace TCC: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Obvod (A.) a Feretův průměr sféroidů (B.) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kulatost (C.) a poměr stran sféroidu (D.) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 3). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01; ***, P ≤ 0,001).



Obrázek 49: Vliv TCC na velikost a tvar sféroidů vytvořených z Leydigových TM3 buněk (4000 b/sf) pomocí vybraných parametrů charakterizujících sféroidy. Koncentrace nasazených buněk: 4000 b/sf, koncentrace TCC: 2; 6; 25 a 100 μM, délka expozice: 0–264 hod. Obvod (A.) a Feretův průměr sféroidů (B.) a jsou vyjádřeny jako procento naivní kontroly v daném čase. U parametrů kulatost (C.) a poměr stran sféroidu (D.) normalizace provedena nebyla. Data jsou prezentována jako průměr z nezávislých opakování ± SEM (n = 3). Statisticky významná odlišnost od rozpouštědlové kontroly je označena „*“ (one-way ANOVA, Dunnettův test: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$).