

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Kultivace lidských žaludečních buněk  
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Linda Mendeová**  
Osobní číslo: **C19267**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Kultivace lidských žaludečních buněk**  
Téma práce anglicky: **Cultivation Of Human Gastric Cells**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

Zpracujte literární rešerši na dané téma bakalářské práce. V rešerši se zaměřte na:

1. Popis stavby žaludeční stěny, žaludeční sliznice a jejich funkcí.
2. Mechanismus změn žaludeční sliznice při vzniku nádorů a polypů.
3. Rozdíly technik pro ustanovení primární linie žaludečních buněk ze zdravé a nádorové tkáně.
4. Přehled postupů pro izolaci a kultivaci žaludeční buněk z endoskopicky odebraných vzorků tkáně při operaci.
5. Bakalářskou práci přehledně zpracujte, použijte obrázky a schémata. Ke zpracování kompilace využijte elektronických databází, např. NCBI Pubmed, ScienceDirect, WoS, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lenka Šmíd, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

LS.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Kultivace lidských žaludečních buněk jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2023

Linda Mendeová v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Mgr. Lence Šmíd, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad při opravách a sepsání této práce. Také bych chtěla poděkovat svojí mamince za velkou podporu a trpělivost.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zabývá kultivací lidských žaludečních buněk. V první části je popsána stavba a funkce žaludku, která je důležitá k porozumění základních žaludečních procesů. Ve druhé části jsou popsány mechanismy vedoucí ke vzniku rakoviny žaludku, která má velmi fatální následky. V poslední části jsou představeny různé studie zabývající se technikami a podmínkami kultivace žaludečních buněk za účelem vytvoření zdravých a nádorových lidských modelů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

žaludek, rakovina, kultivace, organoidy

## **TITLE**

Cultivation of human gastric cells

## **ANNOTATION**

The bachelor thesis deals with the cultivation of human gastric cells. In the first part is described the structure and function of the stomach, which is important for understanding basic gastric processes. In the second part are described the mechanisms leading to constitute stomach cancer, which has very fatal consequences. In the last part are represented various studies dealing with the techniques and conditions of cultivation of gastric cells for the purpose of formation healthy and tumor human models.

## **KEYWORDS**

stomach, cancer, cultivation, organoids

# OBSAH

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>9</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>10</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>1. ŽALUDEK A JEHO MECHANISMY UDRŽUJÍCÍ FYZIOLOGICKÉ FUNKCE</b>	<b>13</b>
1.1. Stavba žaludku .....	13
1.2. Stavba mukózy žaludku .....	14
1.3. Funkce mukózy žaludku .....	16
1.3.1. Regulace kyseliny chlorovodíkové .....	17
<b>2. MECHANISMY ZMĚN VEDOUcí KE KARCINOGENEZI ŽALUDKU .....</b>	<b>18</b>
2.1. Inhibitory protonové pumpy .....	20
2.2. Polypy .....	21
2.2.1. Polypy fundických žláz .....	21
2.2.2. Hyperplastické polypy .....	22
2.2.3. Adenomatózní polypy .....	22
2.3. Infekce <i>Helicobacter pylori</i> .....	23
2.4. Chronická gastritida .....	23
2.5. Atrofická gastritida.....	23
2.6. Metaplazie .....	24
2.7. Dysplazie.....	24
2.8. Karcinomy .....	25
<b>3. KULTIVACE ŽALUDEČNÍCH BUNĚK .....</b>	<b>27</b>
3.1. Dvourozměrná kultivace .....	28
3.2. Trojrozměrná kultivace .....	29
3.2.1. Sféroidy .....	30
3.2.2. Organoidy .....	31
3.3. Techniky pro ustanovení primární linie žaludečních buněk .....	33

<b>4. LABORATORNÍ IZOLACE A KULTIVACE ŽALUDEČNÍCH BUNĚK .....</b>	<b>36</b>
4.1. Postupy pro zpracování vzorku ze zdravé tkáně .....	36
4.2. Postupy pro zpracování vzorku z nádorové tkáně.....	40
<b>5. VYUŽITÍ LIDSKÝCH ŽALUDEČNÍCH MODELŮ .....</b>	<b>43</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>44</b>
<b>SEZNAM ZDROJŮ .....</b>	<b>45</b>



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Stavba žaludeční stěny.....	14
<b>Obrázek 2:</b> Stavba žaludku a uspořádání žaludečních žláz .....	15
<b>Obrázek 3:</b> Povrchová a žlázková odpověď oxyntické žlázy (vlevo) na poškození sliznice: a) povrchová odpověď (nahore), b) žlázková odpověď(dole) .....	19
<b>Obrázek 4:</b> Endoskopické rysy změny mukózy související s inhibitory protonové pumpy: A) polypy fundických žláz, B) hyperplastický polyp, C) a D) mnohočetné bílé a ploché vyvýšené léze, E) sliznice připomínající dlažební kostky a F) černé skvrny .....	21
<b>Obrázek 5:</b> Morfologie karcinomů žaludku .....	26
<b>Obrázek 6:</b> Metoda na základě visící kapky pro tvorbu sféroidů.....	31
<b>Obrázek 7:</b> Rozvržení složek extracelulární matrix interagující s buněčným povrchem.....	32
<b>Obrázek 8:</b> Izolované lidské žlázy pod inverzním mikroskopem .....	37
<b>Obrázek 9:</b> Typický růst stejného žaludečního organoidu po dobu 12 dní .....	39
<b>Obrázek 10:</b> Morfologie nádorového a normálního organoidu.....	42

## SEZNAM ZKRATEK

2D	Dvourozměrný
3D	Trojrozměrný
ALI	Rozhraní vzduch-kapalina (z angl. Air-Liquid Interface)
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. Bovine Serum Albumin)
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EGF	Epidermální růstový faktor (z angl. Epithelial Growth Factor)
EGTA	Kyselina ethylenglykoltetraoctová (z angl. Ethyleneglykoltetraacetic Acid)
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
FBS	Fetální bovinní sérum
FCS	Fetální telecí sérum (z angl. Fetal Calf Serum)
FGF	Fibroblastový růstový faktor (z angl. Fibroblast Growth Factor)
GAPPS	Adenokarcinom žaludku a proximální polypóza žaludku (z angl. Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach)
PBS	Fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (z angl. Phosphate Buffered Saline)
SPEM	Metaplastické buňky exprimující spasmolytický polypeptid (z angl. Spasmolytic Polypeptide Expressing Metaplasia)
TFF2	Rodina proteinů se strukturou podobnou trojlístkům (z angl. Trefoil Factor Family)
TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor beta (z angl. Transforming Growth Factor $\beta$ )

## ÚVOD

V současnosti je v oblasti buněčné biologie hlavní výzvou vývoj buněčných modelů, které by dokázaly přesně simulovat prostředí *in vivo*. Kultivační protokoly ustanovující specifickou buněčnou linii nebo přímo komplexní model orgánu jsou hlavním cílem mnoha výzkumných skupin. Kultivace lidských žaludečních buněk je zásadní nejen k vývoji buněčného modelu sloužícího k testování nových léčiv, ale i k porozumění jednotlivých mechanismů vedoucích k objasnění vzniku patologických změn žaludeční sliznice. V České republice i v dalších zemích aktuálně probíhá výzkum GAPPS – syndromu adenokarcinomu žaludku a mnohočetné polypózy žaludku. Jedná se o autozomálně dominantně dědičný syndrom nádorové predispozice s časně se vyvíjející masivní polypózou žaludku lokalizovanou ve fundu a těle žaludku s vysokým rizikem vzniku adenokarcinomu. GAPPS je tedy variantou syndromu familiární adenomatózní polypózy žaludeční sliznice, který byl nedávno identifikován a je intenzivně sledován i v ČR. Právě pro tyto případy jsou nezbytné výzkumné laboratoře zabývajícími se studiem žaludečních buněk a jejich rolí v prevenci zajišťující správnou funkci žaludeční sliznice. Zhoubné nádory žaludku se vyskytují více u mužů, a to nejčastěji mezi 70. a 80. rokem. Ročně je v České republice diagnostikováno asi 1400 nových onemocnění rakoviny žaludku podle statistiky Masarykova onkologického ústavu v Brně. Přesná příčina vzniku karcinomu žaludku není doposud zcela jasná, ale genetické a rizikové faktory zvyšují pravděpodobnost onemocnění.

Na základě mnoha studií různých poškození, které jsou způsobené enviromentálními a genetickými faktory, vznikají v žaludku ochranné mechanismy. Bohužel tyto ochranné reakce na poškození mohou vést ke karcinogenezi žaludku, na kterém se nejvíce podílí dlouhodobý zánět, který je součástí tzv. Correovy kaskády. Correova kaskáda popisuje postupnou transformaci buněk normální mukózy (žaludeční sliznice) od stádia chronické a atrofické gastritidy, metaplazie a dysplazie až ke vzniku karcinomu. Celý tento proces karcinogeneze může trvat i několik let.

Kvůli vysoké úmrtnosti na rakovinu žaludku se začaly výzkumné týmy intenzivně zabývat kultivacemi žaludečních buněk. Z důvodu omezeného lidského materiálu a nedostatečných informací o kultivaci se nejprve prováděly výzkumy na zvířecích, a to hlavně myších modelech. Ačkoliv myší modely vykazovaly částečnou podobnost s lidskou fyziologií, přesto se časem zavedly i lidské modely na základě techniky dvourozměrné kultivace, ale hlavně daleko přesnější trojrozměrné kultivace. Lidské linie se izolují přímo z patientských biopsií nebo

resekátů nádorů žaludku a existují různé techniky pro zpracování takové tkáně a získání buněk pro následnou kultivaci. Tato bakalářská práce se zabývá postupy úspěšných kultivačních protokolů.

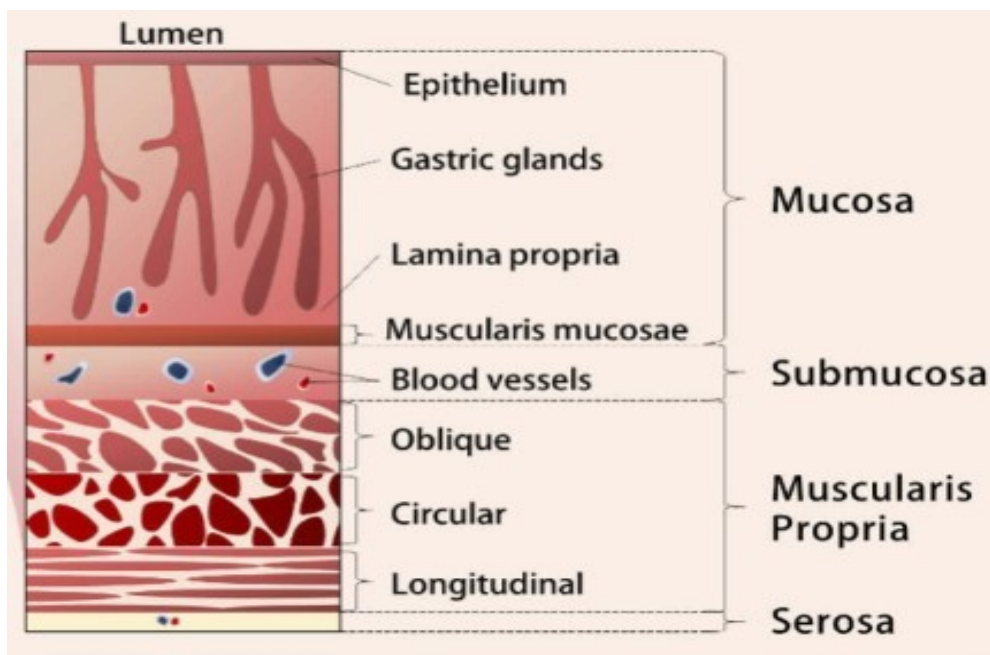
# 1. ŽALUDEK A JEHO MECHANISMY UDRŽUJÍCÍ FYZIOLOGICKÉ FUNKCE

Žaludek představuje důležitý orgán v podobě dutého svalového vaku, který je součástí horního gastrointestinálního traktu a začíná druhou fází trávení. Hlavní funkcí žaludku je sekrece žaludeční kyseliny, a to kyseliny chlorovodíkové, která se podílí na trávicím procesu, a hlavně funguje jako první obranná linie. To znamená, že zabraňuje vstupu mikrobů, které jsou přenášeny společně s potravou do trávicího traktu. [1, 2] Obecně vykonává tři základní funkce. Jako první funkcí je příjem potravy spojené s promícháním a následným uchováním. Druhou funkcí je spustit trávení bílkovin a třetí, poslední funkcí je vyprázdnění potravy do duodena řízenou rychlostí, která ovlivňuje trávení a vstřebávání. [3]

## 1.1. Stavba žaludku

Žaludek se rozděluje na jednotlivé části, a to kardií, fundus, korpus, antrum a pylorus. Kardií je nejproximálnější část žaludku nacházející se v blízkosti gastroezofageální junktce, která obsahuje variabilní počet žláz v rozmezí od 20 do 30. [4, 5] Fundus je horní část žaludku, kde se shromažďuje pouze vzduch, který je přiveden společně s potravou. Pokud je tato část zcela naplněna vzduchem, dochází k uvolnění v podobě eruktace. [3] Korpus je největší část žaludku, která se označuje jako tělo žaludku a je zodpovědná za vylučování žaludeční kyseliny a trávicích enzymů. Antrum je část přiléhající k pylorickému spojení, kde se shromažďuje zpracovaná změkčená potrava a je zodpovědná za sekreci hlenu a hormonů. Pylorus je část, která slouží k vyprazdňování žaludku, a to prostřednictvím pylorického svěrače do duodena (viz obrázek 2). [4, 5, 6, 7]

Stavba žaludeční stěny je uspořádána ve čtyřech vrstvách. Vnitřní vrstvu tvoří žaludeční sliznice, také označovaná jako mukóza. Kolem sliznice je vrstva podslizniční vaziva, tzv. submukóza, která obsahuje cévy. Další vrstvou je svalovina, tzv. *muscularis propria*, která se skládá ze třech svalových vrstev: vnitřní vrstva ze šikmého svalu, uprostřed vrstva z kruhového svalu, která se podílí na stahující motorické aktivitě a vnější vrstva z podélného svalu. Zevní vrstva se označuje jako seróza, která pokrývá povrch žaludku (viz obrázek 1). [3, 8] Seróza představuje serózní membránu, tzv. *peritoneum* (pobřišnici), které se dělí na parietální a viscerální. Parietální *peritoneum* lemuje břišní stěnu a viscerální *peritoneum* pokrývá povrch orgánů a mezi nimi je prostor zvaný parietální dutina, ve které se nachází velmi malé množství tekutiny. *Peritoneum* se skládá z jednovrstevného epitelu zvaného jako mezotel a ovlivňuje distribuci a proudění tekutiny v břiše. [9]



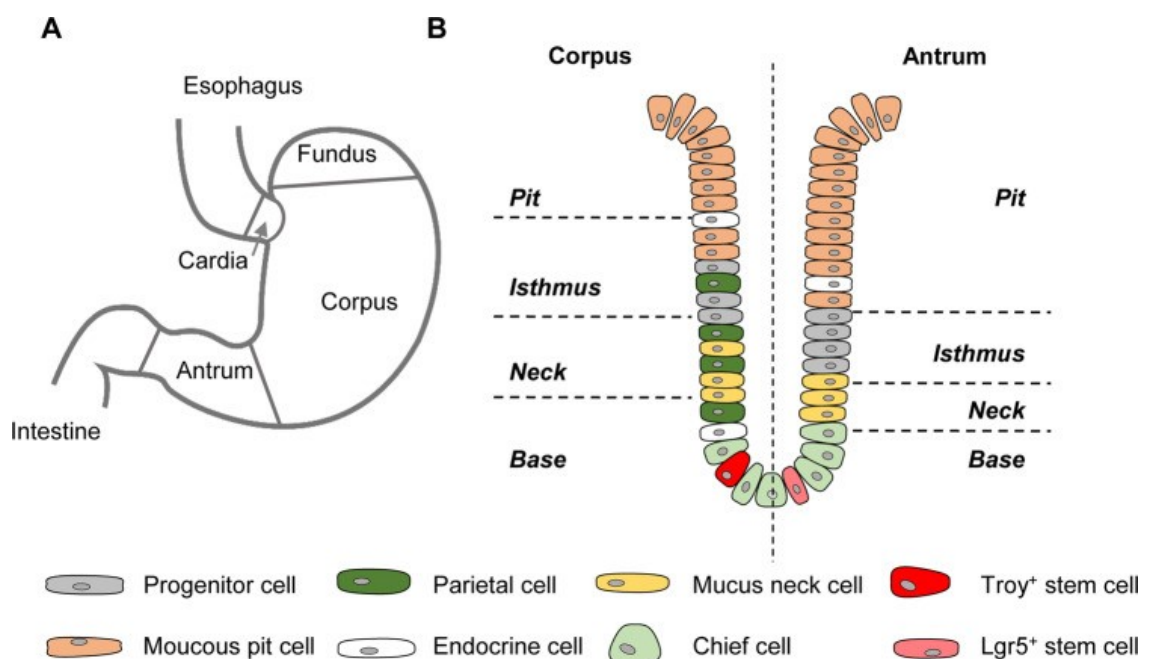
**Obrázek 1:** Stavba žaludeční stěny [8]

## 1.2. Stavba mukózy žaludku

Mukóza se rozděluje do tří vrstev, a to epiteliální vrstva, *lamina propria* a *muscularis mucosae* (viz obrázek 1). [8] Vrstva epitelu je uspořádána do hlubokých invaginací označované jako žaludeční žlázy, které obsahují různé typy buněk a dělí se podle funkce na: hlavní, parietální, mucinózní buňky krčku, mukózní buňky jamek, progenitorové a neuroendokrinní buňky. [4, 10, 11] Hlavní buňky vylučují trávicí enzymy, jako je pepsinogen, které jsou uloženy v intracelulárních granulích. Parietální buňky vylučují kyselinu chlorovodíkovou a vnitřní faktor. Mucinózní buňky krčků a mukózní buňky jamek obsahují muciny, které jsou uloženy v granulích a vylučují se v podobě hlenu za vzniku silné bariéry pro ochranu epitelu před toxickými sloučeninami a mikroby. Progenitorové buňky jsou málo diferencované buňky, pocházející z kmenových buněk, které dávají vzniknout všem typům žaludečních buněk. Jedná se o buněčné dozrávající prekurzory, které mají kromě schopnosti proliferace a diferenciaci i schopnost migrace určitým směrem. Tyto buňky se pohybují od báze směrem k povrchu krypty (žlázy), a tím vytváří nové buňky typické pro danou oblast. [10, 11] Neuroendokrinní buňky vylučují hormon ghrelin a patří sem G-buňky produkující gastrin, D-buňky produkující somatostatin a enterochromafinní buňky produkující histamin. Žlázy se rozdělují podle lokalizace na žlázy kardié, korpusu (oxyntické) a antrální. Žlázy v kardií jsou spíše podobné svými vlastnostmi antrálním žlázám, a to z důvodu nepřítomnosti parietálních a hlavních buněk. [4] Oxyntické žlázy se nacházejí v korpusu a jsou složeny převážně z parietálních a hlavních buněk. Antrální žlázy se nacházejí v antru a jsou složeny převážně z mukózních

buněk. [11] Z hlediska neostrého ohraničení mezi oxyntickými a antrálními žlázami antrum obsahuje směs oxyntických a antrálních žláz s tím, že oxyntické žlázy v antru obsahují parietální a hlavní buňky v nižším množství než v korpusu. [4]

Rozmístění těchto buněk rozděluje žlázu na čtyři oblasti, a to bázi, krk, isthmus a jamku a tvoří dohromady žaludeční jednotku. Po celé žláze jsou rozmístěny neuroendokrinní buňky. Báze většinou obsahuje hlavní buňky. Krk obsahuje mukózní krční buňky a parietální buňky. Isthmus obsahuje progenitorové buňky a také parietální buňky. Jamka je široká tubulární prohlubeň, tzv. krypta na luminálním povrchu sliznice a obsahuje mukózní jamkové buňky (foveolární buňky) (viz obrázek 2). [5, 10, 12]



**Obrázek 2:** Stavba žaludku a uspořádání žaludečních žláz [5]

Homeostáza žaludečního epitelu závisí na proliferaci, diferenciaci, migraci a smrti jednotlivých typů buněk, které jsou přísně regulovány pro udržení funkce a integrity epiteliální bariéry. Obnova epitelu probíhá prostřednictvím replikace kmenových a progenitorových buněk, které migrují a diferencují se směrem k různým buněčným typům za účelem obnovy celé žlázy. Kmenové buňky, které se nacházejí na bázi žlázy, jsou dlouhověké, multipotentní a schopné neustálé obnovy. To znamená, že jsou schopné zcela nahradit poškozenou tkáň produkcí progenitorových buněk a jejich následnou diferenciací. [10, 5]

Pod epitelem je vrstva *lamina propria*, což je slizniční vazivo a poté je svalová vrstva *muscularis mucosae*, která odděluje mukózu od submukózy (viz obrázek 1). [8]

### 1.3. Funkce mukózy žaludku

Mukóza je neaktivnější vrstvou žaludeční stěny, která má více funkcí. Podílí se na trávení potravy a metabolických procesech žaludku. [13] Před škodlivými vlivy je mukóza chráněna vytvořenou bariérou, která je složena z epitelálních buněk, cévního a nervového zásobení. Epiteliální buňky jsou důležité z hlediska udržení integrity a funkce mukózy. Bariéra mukózy představuje komplexní systém zajišťující fyzikální, chemické a biologické obranné mechanismy před dráždivou potravou, žaludeční kyselinou a nadměrnou aktivitou pepsinu. Nepříznivě působí i exogenní faktory, kterými jsou stres, infekce, nadměrný příjem alkoholu a dlouhodobé užívání drog. [14]

Další funkcí mukózy je uplatnění při imunitních reakcích prostřednictvím vrozené a adaptivní imunity, a tím zabránit vzniku a rozvoji infekčního i neinfekčního onemocnění a karcinogenezi žaludku. Vrozená imunita patří mezi přirozenou nespecifickou imunitu, která představuje první linii imunitní obrany a je založena na rozpoznávání a fagocytování patogenů. Skládá se z epitelálních buněk mukózy, makrofágů, dendritických buněk a NK buněk (přirození zabijáci). Obecně epiteliální buňky mohou exprimovat hlavní histokompatibilní komplexy II. třídy jako buňky prezentující antigen, které se podílí na imunitní obraně. Také se podílí na aktivaci vrozených imunitních buněk, proliferaci a diferenciaci T a B lymfocytů, vylučování cytokinů a na regulaci lokální imunitní odpovědi. Makrofágy produkují cytokiny, které se podílejí na imunitní regulaci a vzniku adaptivní imunity a stimulují imunitní odpověď. Aktivované zralé dendritické buňky působí jako antigen prezentující buňky, které se účastní počáteční imunitní odpovědi a navozují adaptivní imunitní reakce prostřednictvím signalizace Toll-like receptoru aktivací efektorových T a B buněk. Adaptivní imunita patří mezi specifickou imunitu, která představuje druhou linii imunitní obrany a proces prevence infekce. Skládá se z T a B lymfocytů. T lymfocyty se označují za buněčnou imunitu a důležitou roli hrají pomocné a regulační T lymfocyty. B lymfocyty se označují za humorální imunitu a produkují imunoglobuliny. [15, 16]

V případě poškození nebo infikování mukózy patogeny dochází k aktivaci epitelálních buněk, které zahajují vrozenou imunitní odpověď. Dochází k migraci imunitních buněk do mukózy a shromažďují se ve vrstvě *lamina propria*. Imunitní buňky se nacházejí v cévách, kde interagují s aktivovanými vaskulárními endoteliálními buňkami, které zpomalují rychlost průtoku imunitních buněk v krvi a způsobí, aby se pohybovaly podél cévní stěny. Takto se imunitní buňky mohou vázat na fixované chemokiny prostřednictvím chemokinových receptorů, které se podílejí na přilnutí imunitních buněk k buněčnému povrchu endoteliálních



buněk prostřednictvím adhezivních molekul ze skupiny integrinů. Navázané imunitní buňky migrují přes endoteliální buňky do mukózy. [15, 16]

### **1.3.1. Regulace kyseliny chlorovodíkové**

Kyselina chlorovodíková je sekretována parietálními buňkami. Na základě sekrece do žaludečního lumen se vytvoří velmi silně kyselé prostředí o hodnotě pH 1–2, které je potřebné pro trávení potravy, vstřebávání minerálů včetně fosfátů, vápníku a železa a pro zabíjení bakterií přítomných v potravě. Regulace sekrece kyseliny je řízena několika mechanismy, a to prostřednictvím neurohumorální regulace pomocí stimulačních a inhibičních mediátorů. Na inervaci horní gastrointestinální sliznice se účastní bloudivý nerv, který reguluje sekreci na základě aferentních a eferentních signálů. Mezi hlavní stimulační mediátory patří: acetylcholin, gastrin, histamin a ghrelin. Mezi hlavní inhibiční mediátory patří: somatostatin, prostaglandiny a oxid dusnatý. Sekrece musí být regulována, protože vysoké hladiny kyseliny vedou k následnému porušení integrity žaludeční sliznice, a z tohoto důvodu musí být zachována mezi nimi rovnováha. Na regulaci se účastní více cest včetně neuronových a endokrinních, které jsou zprostředkované enterickým nervovým systémem a enteroendokrinními buňkami. V korpusu se nacházejí enterochromafinní buňky produkující histamin a X buňky produkující ghrelin. Tyto buňky aktivují parietální buňky pomocí parakrinních a nervových drah. V antrum se nacházejí G buňky produkující gastrin, který stimuluje sekreci kyseliny. Po celém žaludku jsou rozmístěny D buňky produkující somatostatin, který inhibuje sekreci kyseliny z parietálních buněk. [4, 11]

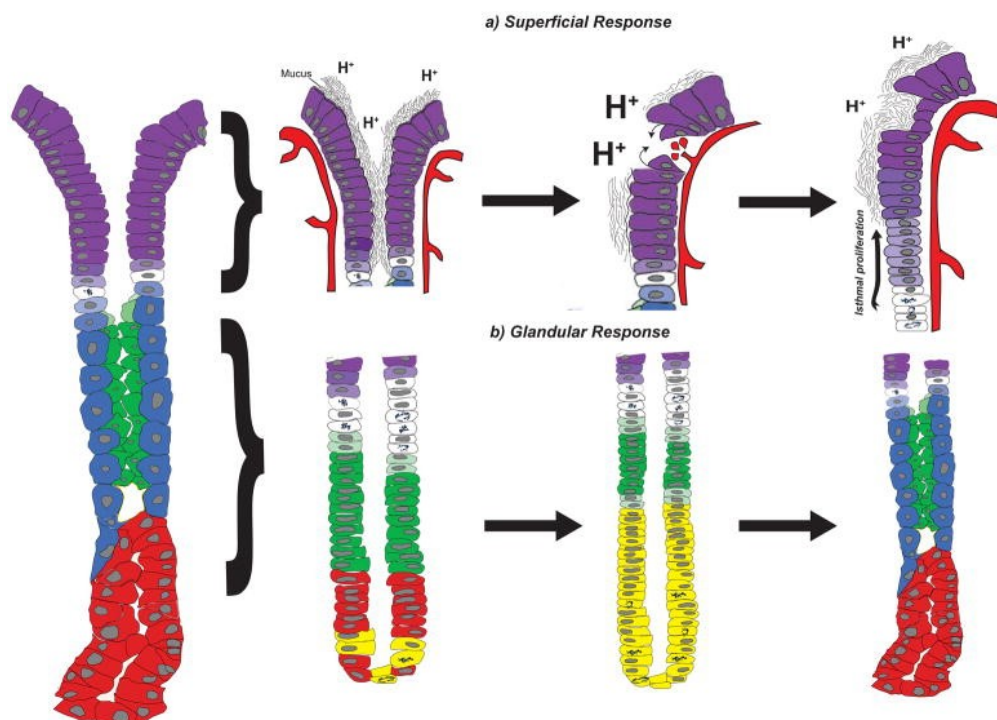
## 2. MECHANISMY ZMĚN VEDOUcí KE KARCINOGENEZE ŽALUDKU

Karcinogeneze žaludku je vícestupňový a multifaktoriální proces, na kterém se podílejí genetické a enviromentální faktory. Mezi tyto predisponující faktory patří: infekce *Helicobacter pylori*, virus Epstein-Barrové, dlouhodobé užívání inhibitorů protonové pumpy, stravovací návyky a užívání návykových látek. Jako další predispozice jsou prekancerózní stavy, kterými jsou chronická a atrofická gastritida, metaplazie, infekce nebo autoimunita, vředy, žaludeční pahýl po částečné gastrektomii a žaludeční polypy. Vícestupňový proces karcinogeneze se nazývá Correova kaskáda, která představuje model popisující primární patogenní faktor pro rozvoj rakoviny žaludku. Tímto primárním patogenním faktorem je dlouhodobý zánět. Correova kaskáda může trvat i několik let a znázorňuje, jak se postupně vyvíjí normální mukóza přes chronickou gastritidu (chronický zánět žaludeční sliznice), atrofickou gastritidu (ztráta žaludečních žláz) a metaplazii (nahrazení žaludečního epitelu střevním epitelem) k dysplazii (intraepiteliální neoplazii) a karcinomu. [17] Obecně metaplazie je definována jako změna v buněčné identitě [18] a dysplazie jako abnormální vývoj buněk. [17]

V žaludku se vytvořily ochranné mechanismy, které chrání mukózu před poškozením. Tyto mechanismy se rozlišují na základě hloubky poškození na povrchové a hlubší. Povrchové poškození je v případě porušení integrity mukózy chemickými nebo fyzikálními vlivy nebo bakteriemi a jejich toxiny. V důsledku poškozených nebo obnažených povrchových buněk dochází k následnému odlupování buněk od sliznice, a to může následně vyvolat hluboké poškození sliznice, slizniční ischemii, hypoxii a nekrózu tkáně. Bariéra tímto ztrácí svou funkčnost tak, že se snižuje regulace průtoku krve a vznikají vředy a eroze. [19, 20] Tato poškození jsou poté rychle opravena zvýšenou proliferací buněk a migrací povrchových buněk za účelem obnovení normální diferenciaci v poškozených částech prostřednictvím kmenových buněk. [20, 21] Tato proliferativní odpověď může způsobit takové zmnožení buněk, které následně vede k foveolární hyperplazii. [20] Zmnožení buněk neboli hyperproliferace je důsledkem narušení rovnováhy mezi buněčnou proliferací a apoptózou. To znamená, že z benigních hyperplazií se mohou vyvíjet malignity, a proto se hyperplazie může považovat za jeden z rizikových faktorů karcinogeneze žaludku. [22] V případě hlubšího poškození, které se projevuje jako chronické, dochází ke spuštění metaplazie celého epitelu, kdy dochází ke ztrátě parietálních buněk. Tato ztráta způsobí snížení endogenní produkce kyseliny chlorovodíkové. Poté jsou hlavní buňky vylučující za normálních okolností pepsin

přenastaveny na buňky vylučující mucin za účelem hojení poškození. Během metaplazie dochází také k hyperproliferaci buněk krčku vylučující hlen a foveolárních povrchových slizničních buněk. Pokud se jedná o akutní poškození, tak všechny uskutečněné změny jsou krátkodobě reverzibilní. [20]

Reakce na povrchové poškození se označuje jako povrchová odpověď, která vzniká na základě poškození povrchového epitelu v důsledku nadměrné sekrece kyseliny, snížené produkce hlenu nebo ischemie vedoucí k vředům nebo krvácení. Na poškození reaguje zvýšením produkce hlenu, obnovením lokálního průtoku krve a obnovením integrity epitelu prostřednictvím restituce a buněčné proliferace za účelem obnovení ochranné bariéry povrchového epitelu. Reakce na hlubší poškození se označuje jako žlázková odpověď, která vzniká na základě ztráty (atrofie) parietálních buněk (modré na obr. 3) produkující kyselinu. Na ztrátu parietálních buněk reaguje nahrazením hlubšího epitelu metaplastickými buňkami (žluté na obr. 3), které současně exprimují proteiny, a to TFF2 (rodina proteinů se strukturou podobnou trojlístkům, známý jako spasmolytický polypeptid), který je obvykle exprimován progenitorovými mukózními krčními buňkami (zelené), a pepsinogen, trávicí enzym exprimovaný zralými hlavními buňkami (červené). Tato metaplastická reakce se nazývá jako metaplazie asociována se spasmolytickým polypeptidem, při níž je buňkami tento polypeptid exprimován. Jedná se o přechodnou reakci, než se obnoví homeostáza (viz obrázek 3). [11]

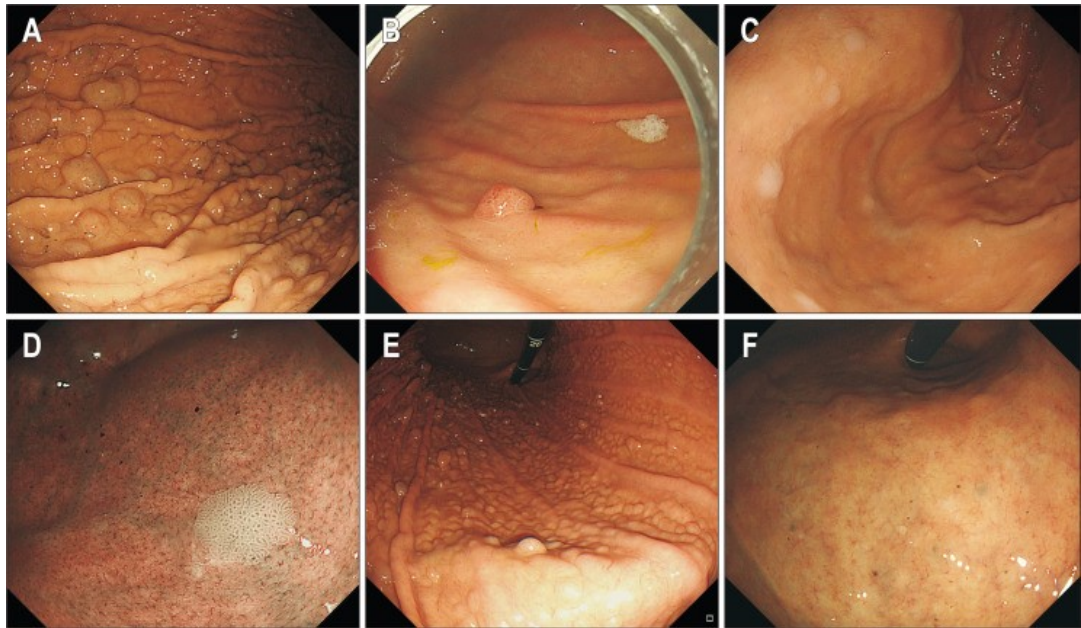


**Obrázek 3:** Povrchová a žlázková odpověď oxyntické žlázy (vlevo) na poškození sliznice: a) povrchová odpověď (nahore), b) žlázková odpověď(dole) [11]

## 2.1. Inhibitory protonové pumpy

Inhibitory protonové pumpy jsou neúčinnější léky, které se používají při léčbě onemocnění jako je gastroezofageální refluxní choroba a peptický vřed. Nicméně by se tyto inhibitory neměly používat dlouhodobě, protože způsobují histopatologické změny. [23] Inhibitory se naváží na parietální buňky za účelem inhibice sekrece žaludeční kyseliny a dochází k hypoaciditě (zvýšení pH). Z hlediska hypoaciditě jsou inhibovány D buňky produkující somatostatin, který by následně inhiboval sekreci gastrinu z G buněk, a z tohoto důvodu dochází ke zvýšené sekreci gastrinu, která vede k hypergastrinémii (zvýšená hladina gastrinu nad horní referenční rozmezí). Gastrin má trofické účinky na žaludeční sliznici a dlouhodobé zvýšení gastrinu má karcinogenní účinky. [24] Hypergastrinémie může vyvolat hyperplazii foveolárního epitelu vedoucí k následné tvorbě hyperplastických polypů. Dochází ke změnám v morfologii parietálních buněk, které se zvětšují a zmnožují a dochází k proliferaci enterochromafinních buněk. Histopatologicky se zvětšení parietálních buněk projevuje vyboulením do lumen oxyntických žláz, které se označuje jako tzv. výčnělek, ve kterém se shromažďuje kyselina chlorovodíková v důsledku inhibice jejího aktivního uvolňování. Tyto výčnělky parietálních buněk vedou k cystické dilataci fundických žláz a cytoplazmatické vakuolizaci. Cystická dilatace fundických žláz vzniká z důvodu obstrukce odtoku, které je způsobeno výčnělky parietálních buněk a ucpáním hlenem vylučovaný z jamkových buněk, které může následně vést ke zvětšování a postupné tvorbě polypů fundické žlázy. [22, 23]

To znamená, že všechny tyto změny se při endoskopickém vyšetření mohou projevovat jako polypy fundických žláz, hyperplastické polypy, [17] mnohočetné bílé a ploché vyvýšené léze, sliznice připomínající dlažební kostky a černé skvrny. Polypy fundických žláz jsou mnohočetné, malé (menší jak 1 cm), přisedlé, bělavě růžové a mají hladký, částečně průsvitný povrch. Většinou se nacházejí v žaludečním korpusu a fundu. Mnohočetné bílé a ploché vyvýšené léze znázorňují ostře ohraničené kulaté a mírně vyvýšené sliznice s hladkým povrchem. Nacházejí se většinou v horním žaludečním korpusu a fundu a pozorováním lze identifikovat tubulární struktury na jejich povrchu. Sliznice připomínající dlažební kostky je charakteristická četnými 3 až 5 mm velkými, nerovnoměrnými, vyvýšenými slizničními lézemi v korpusu žaludku. Zbarvení je podobné okolní sliznici a často se vyskytuje mezi žaludečními záhyby a mají nadýchaný vzhled. Černé skvrny se projevují jako černě zbarvená pigmentace a mají podobu krevní sraženiny na povrchu mukózy, která je plochého vzhledu. Nacházejí se také v korpusu a fundu (viz obrázek 4). [23]



**Obrázek 4:** Endoskopické rysy změny mukózy související s inhibitory protonové pumpy: A) polypy fundických žláz, B) hyperplastický polyp, C) a D) mnohočetné bílé a ploché vyvýšené léze, E) sliznice připomínající dlažební kostky a F) černé skvrny [23]

## 2.2. Polypy

Žaludeční polypy jsou definovány jako abnormální růst tkáně vyčnívající z mukózy do lumen a obsahují hlavičku a někdy i stopku. [25, 26] Vznikají ve všech částech žaludku a mohou se vyskytovat buď sporadicky nebo u genetických syndromů, které jsou asociovány se vznikem polypů. Polypy mohou směřovat k maligním transformacím, které následně vedou k rakovině. [25, 27]. Z hlediska makroskopického vzhledu se polypy rozdělují na ploché, přisedlé, polostopkaté a stopkaté. Ploché polypy jsou mírně vyvýšené do výšky 2,5 mm a mají nezřetelné okraje. Přisedlé polypy jsou vyvýšené nad výšku 2,5 mm a mají výrazné okraje bez zářezu na bázi. Polostopkaté polypy jsou stejně vyvýšené jako přisedlé a mají výrazné okraje s jasným zářezem na bázi bez stopky. Stopkaté polypy jsou stejné jako polostopkaté, ale mají stopku. [25] Z hlediska histomorfologie se polypy rozdělují na polypy fundických žláz, hyperplastické a adenomatózní. [27]

### 2.2.1. Polypy fundických žláz

Polypy fundických žláz jsou nejběžnějším typem, které představují nenádorové léze, protože se jedná o retenční cysty způsobené poruchou sekrece korpusových žláz. Vyskytují se sporadicky v případě užívání inhibitorů protonové pumpy. Při jejich dlouhodobém užívání dochází ke zvýšenému riziku rozvoje těchto polypů. Inhibitory protonové pumpy zajišťují supresi produkce kyseliny chlorovodíkové a jejich užíváním může docházet k hyperplazii a vzniku malých až větších cyst fundických žláz. Jejich výskyt je také spojován se syndromem

familiární polypózy. [28] Polypy fundických žláz jsou histologicky složeny z jedné nebo více dilatovaných oxyntických žláz, které jsou lemované zploštělými parietálními a mukózními buňkami. [26] Okolní mukóza je zde normální, bez atrofie nebo střevní metaplazie, ale časem se postupně může projevovat dlouhodobé používání inhibitorů protonové pumpy. [28]

### **2.2.2. Hyperplastické polypy**

Hyperplastické polypy jsou nejčastější epiteliální polypy žaludku a mohou být jednotlivé, které převládají, nebo vícečetné. Vyskytují se sporadicky jako izolované polypy nebo jsou spojovány se vzácným syndromem hyperplastické polypózy, kdy se nachází 50 a více polypů. [25, 28] Výskyt těchto polypů přináší zvýšené riziko neoplazie žaludku. [27] Hyperplastické polypy se obecně řadí mezi benigní polypy, ale z hlediska toho, že vznikají společně s gastritidou a žaludeční atrofií nebo v důsledku poranění, které podněcuje regeneraci a proliferaci, se stávají rizikovými faktory pro vznik rakoviny. [28] Tyto polypy znázorňují proliferativní léze, které vznikají v případě poškození mukózy, kdy jsou zahájené reparativní a regenerační procesy. Tato hyperplastická reakce přetrvává a vyvíjí se právě s tvorbou těchto polypů. [25, 28]

### **2.2.3. Adenomatózní polypy**

Adenomatózní polypy neboli adenomy (známé jako zvýšené intraepiteliální neoplazie) jsou neoplastické léze, které jsou definované epiteliálním dysplastickým růstem. Žaludeční adenomy se skládají z dysplastických epiteliálních buněk, které vznikají v souvislosti se střevní metaplazií a atrofií způsobené infekcí *Helicobacter pylori* a jedná se o prekurzory adenokarcinomů žaludku. [26] Rozdělují se na adenomy vycházející z foveolárního kompartmentu, kam patří adenomy foveolárního a střevního typu a adenomy vycházející ze žláзовého kompartmentu, kam patří adenomy oxyntické a pylorické žlázy. [17] Adenomy foveolárního typu jsou epiteliální polypy, které se vyskytují jako solitární léze a skládají se z neoplastického foveolárního epitelu s mucinózními buňkami. Vyskytují se v normální mukóze bez metaplazie, atrofie nebo zánětu. Projevují se přinejmenším dysplazií nízkého stupně, málokdy dysplazií vysokého stupně a představují nízké riziko vedoucí k maligní transformaci. [28] Jejich výskyt je většinou spojován se syndromy jako jsou familiární adenomatózní polypóza (FAP) a adenokarcinom žaludku a proximální polypóza žaludku (GAPPS). Sporadický výskyt je zřídka. [29] Adenomy střevního typu jsou lokalizované jako polypoidní léze, které jsou složeny z dysplastického střevního epitelu obsahující pohárkové, Panethovy, absorpční a endokrinní buňky. Typická je dysplazie nízkého stupně, může se projevovat i dysplazií vysokého stupně. Vyskytují se při střevní metaplazii, atrofii

nebo zánětu. Adenomy střevního typu mají vyšší riziko vedoucí k maligní transformaci než adenomy foveolárního typu. [28] Adenomy oxyntické žlázy jsou benigní novotvary složené z dysplastických žláz s diferenciací hlavních a parietálních buněk. Většinou se vyskytují v neatrofické oxyntické sliznici a mohou se vyvinout v adenokarcinom žaludku typu fundické žlázy. Adenomy pylorické žlázy jsou epiteliální polypy složené z těsně uzavřených dilatovaných žláz epitelu pylorického typu. Vyskytují se v oxyntické sliznici s atrofickými změnami způsobené autoimunitním zánětem, infekcí a FAP. [17, 29]

### **2.3. Infekce *Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* je gramnegativní mikroaerofilní spirálovitá bakterie s bičíky, které slouží k pohyblivosti umožňující bakteriím vstoupit do vrstvy hlenu. Dokáže přežít v kyselém prostředí žaludku, protože produkuje enzym ureáza, který hydrolyzuje močovinu na oxid uhličitý a amoniak, který neutralizuje žaludeční kyselinu. [30, 31] Díky neutralizaci jsou bakterie schopné kolonizovat mukózu a přilnout k žaludečnímu epitelu prostřednictvím adhezních proteinů. Infekce *Helicobacter pylori* souvisí se vznikem peptických vředů a předpokládá se, že způsobuje chronickou a atrofickou gastritidu, metaplazii žaludku, dysplazii a většinou střevní typ rakoviny žaludku. Postupný průběh této infekce většinou trvá i několik desítek let a je doprovázen rostoucím rizikem maligní transformace. [30]

### **2.4. Chronická gastritida**

Chronická gastritida je zánětlivý stav mukózy a označuje se za neatrofickou neboli povrchovou gastritidu. Vzniká nejčastěji v důsledku infekce *Helicobacter pylori*. Dalším podnětem může být autoimunitní onemocnění. Chronická gastritida může postupně přecházet na atrofickou gastritidu. [32]

### **2.5. Atrofická gastritida**

Atrofická gastritida je chronický zánětlivý proces mukózy spojený se ztrátou žaludečních žláz a sníženou sekreční funkcí žaludku. [30] Jedná se o pomalý proces, kdy po dlouhodobém zánětu dochází k atrofii žaludeční sliznice projevující se postupným zmenšováním žaludečních žláz až k jejich úplnému vymizení. [32, 33] Žlázy mohou být nahrazeny buď pojivovou tkání (nemetaplastická atrofie), nebo jiným typem epitelu (metaplastická atrofie). [33] V případě rozsáhlého rozšíření atrofické gastritidy, které souvisí se stavem anchlorhydrie nebo hypochlorhydrie se zvyšuje riziko pro rozvoj rakoviny žaludku. [30] Nejčastější příčinou vzniku je chronická infekce *Helicobacter pylori* nebo autoimunita. Nejčastěji se atrofická gastritida projevuje právě střevní metaplazií. [33]

## 2.6. Metaplazie

Metaplazie znamená nahrazení terminálně diferencovaných buněk žaludeční sliznice diferencovanými buňkami, které jsou typické pro jinou oblast nebo z jiného vývojového stadia nebo i dokonce z jiného orgánu (střevo). [18, 20] Metaplastické léze obvykle obsahují buňky vylučující hlen, které vznikají za účelem ochrany a hojení po prodělaném poškození. Existují dva hlavní typy metaplazie, a to pylorická a střevní. Pylorická metaplazie je definována jako kompletní změna mezi povrchem a žlázou, ke které dochází během atrofické gastritidy. Funguje jako akutní reparační mechanismus, který vede ke zvýšené tvorbě progenitorových buněk, které uvolňují ochranné faktory napomáhající k hojení tkáně. Projevuje se abnormalitami jako je např. foveolární hyperplazie a změna v počtu mukózních krčních buněk. [20] Léze pylorické metaplazie se projevují ztrátou parietálních buněk a nahrazením bazálních hlavních buněk buňkami SPEM (metaplastické buňky exprimující spasmolytický polypeptid) prostřednictvím transdiferenciace. Transdiferenciace znamená nahrazení diferencovaných buněk jinými buňkami, které se nacházejí ve stejné tkáni. [20, 34] To znamená, že vznik pylorické metaplazie představuje přechodnou odpověď organismu na poškození žaludeční tkáně prostřednictvím zmnožení buněk za účelem regenerace tkáně. Po reparaci se zmnožené buňky reverzibilně diferencují na zralé buňky nebo se nahradí normálními žaludečními buněčnými typy. V případě, že by se jednalo o chronické poškození nebo přetrvávající zánět tkáně, metaplazie se stane stabilní a přetrvává. Dokonce se může transformovat na jiné typy metaplazie nebo až na dysplazii. [20]

Druhým typem metaplazie, je typ střevní. Tento typ metaplazie je považován za prekursorovou lézi, která vede ke vzniku karcinomu žaludku. Jedná se o nahrazení oxyntické nebo antrální žaludeční sliznice střevní sliznicí, tedy plně diferencovanými buněčnými typy odlišného orgánu. [35] Dělí se na dva typy, a to kompletní a nekompletní. Kompletní střevní typ metaplazie se podobá epitelu tenkého střeva, který je složen z Panethových, pohárkových a absorpčních buněk. Nekompletní střevní typ metaplazie se podobá epitelu tlustého střeva, který je složen ze sloupcových a pohárkových buněk. U obou typů je detekována exprese střevního mucinu 2, který není normálně v žaludeční sliznici exprimován. [36]

## 2.7. Dysplazie

Dysplazie žaludku, označována jako intraepiteliální nebo neinvazivní neoplazie, je definována neoplastickými změnami, které jsou omezené pouze na žaludeční epitel bez vniknutí do vrstvy lamina propria. [17, 37] Neoplastické změny se projevují buněčnou



atypií, abnormální diferenciací, neuspořádaností a zvýšenou mitotickou aktivitou buněk. Endoskopicky jsou viditelné jako ploché nebo polypoidní léze. Mohou vzniknout buď spontánně (de novo), nebo na základě již přítomných benigních sporadických polypů. Na základě histomorfologie se dysplazie dělí na střevní a foveolární typ. Z hlediska distorze, vlastností jaderných a cytoplazmatických buněk a mitotické aktivity se dysplazie dělí na nízký a vysoký stupeň. [17] Dysplazie nízkého stupně je znázorněna žlázami, které jsou lemovány sloupcovými buňkami s hyperchromatickými, protáhlými a pseudostratifikovanými jádry, které si zachovávají polaritu. Projevuje se minimální změnou ve stavbě žláz, kdy buňky jsou mírně atypické. Dysplazie vysokého stupně obsahuje dysplastické buňky obvykle kvádrové než sloupcové, které ztratily jadernou polaritu a prominentní jádérko. Projevuje se výraznou mitotickou aktivitou, která je někdy doprovázena atypickými mitózami. [37]

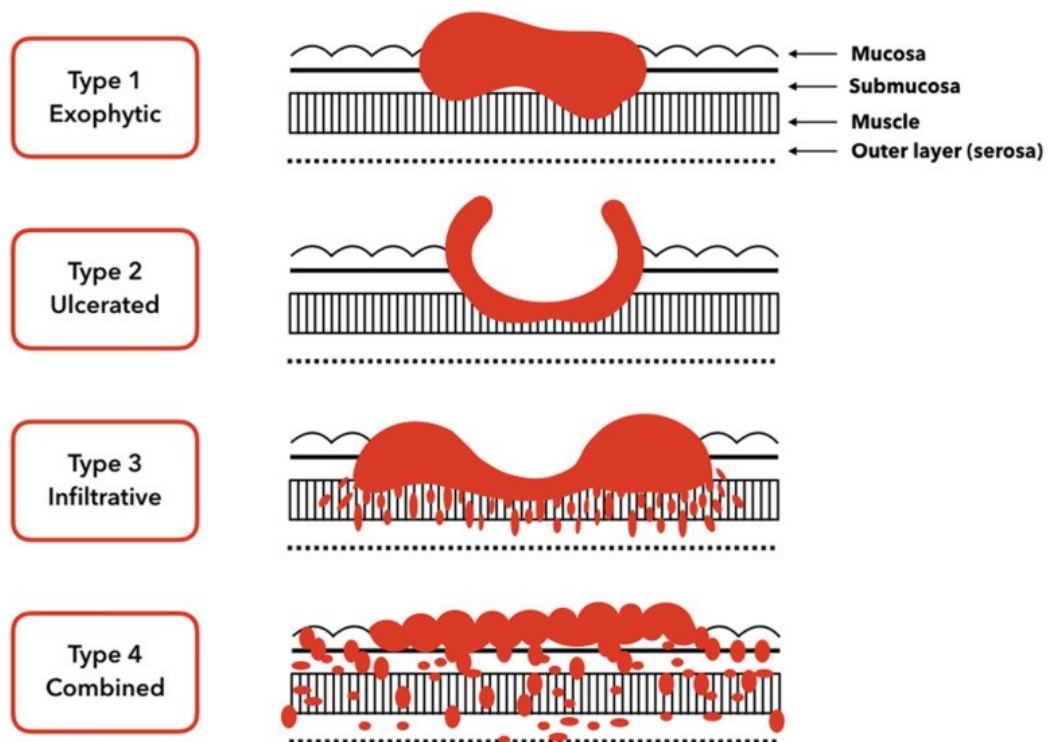
## **2.8. Karcinomy**

Karcinomy žaludku jsou maligní nádory, které se neřídí normální regulací proliferace a mají schopnost pronikat do jiných tkání a metastázovat do jiných orgánů. Na vzniku karcinomů se podílejí pouze buňky, které jsou schopné se dělit, protože každé dělení buňky představuje malé riziko mutace. Většina chyb při replikaci DNA je opravena, ale další mutace mohou vzniknout následkem vrozených chyb, přímými mutageny (např. poškození DNA ozářením nebo chemikáliemi) nebo mitogeny, které zvyšují počet dělení a zkracují dobu dělení. To znamená, že vznikají na základě genetických mutací způsobující změny v nádorových buňkách, které se postupně přeměňují na malignější. [38]

Karcinomy žaludku se rozdělují na základě histopatologických klasifikací, mezi které patří: Laurenova klasifikace, klasifikace Světové zdravotnické organizace a Bormannova klasifikace. Laurenova klasifikace rozděluje karcinomy na dva hlavní typy, a to střevní a difúzní. Střevní typ je definován přítomností žlázového růstového vzoru, který se skládá ze žláz nebo papil. Difúzní typ je definován infiltrativním růstovým vzorem, kdy nádorové buňky neudržují buněčnou soudržnost. Klasifikace Světové zdravotnické organizace rozlišuje karcinomy na papilární, tubulární, mucinózní a karcinomy z prstencových buněk. [17, 39] Papilární karcinom je složen z papilárních struktur a v případě, že obsahuje i žlázové struktury, tak se označuje za tubulopapilární karcinom. Tubulární karcinom je složený z tubulárních, žlázových nebo acinárních struktur. Mucinózní karcinom je tvořen z nahromaděného mucinu, který zaujímá více jak polovinu obsahu karcinomu. Karcinom z prstencových buněk je tvořen buňkami prstencové struktury a tyto buňky obsahují mucinovou vakuolu, která vyplňuje cytoplazmu a vytlačuje jádro k periferii buňky. Srovnání mezi těmito dvěma klasifikacemi

je takové, že papilární a tubulární karcinomy jsou přibližně shodné se střevním typem karcinomu a karcinom z prstencových buněk je přibližně shodný s difúzním typem karcinomu. [17]

Na základě hloubky invaze do žaludeční stěny se karcinomy dělí na časné a pokročilé. Časné karcinomy jsou omezené pouze na mukózu a submukózu a jsou malé o velikosti kolem 2-5 cm. Mohou být doprovázeny metastázemi do lymfatických uzlin a některé z nich mohou být multifokální. Pokročilé karcinomy nejsou nijak omezené, pronikají až do muscularis propria i hlouběji. [17, 37, 40] Rozdělují se podle Bormannovy klasifikace na základě makroskopického vzhledu na čtyři typy. Prvním typem jsou polypoidní, druhým typem jsou ulcerované s přesně určenými hranicemi, třetím typem jsou ulcerované s nepravidelnými a infiltrativními okraji a čtvrtým typem jsou difúzní infiltrativní bez prokázání vředu (viz obrázek 5). [37, 39]



Obrázek 5: Morfologie karcinomů žaludku [40]

### 3. KULTIVACE ŽALUDEČNÍCH BUNĚK

Rakovina žaludku je vysoce maligní a heterogenní onemocnění, a proto je důležité pochopit základní mechanismy, které vedou a podílejí se na vzniku tohoto onemocnění. Detailním porozuměním těchto mechanismů se může nastavit správná léčba a vyvinout nové účinnější léky. [41] Právě proto je důležitá technika izolace a kultivace žaludečních buněk za účelem ustanovení vhodného buněčného modelu sloužícího k lepšímu pochopení mechanismů onemocnění, objevování nových léků a ke studiu regenerační schopnosti kmenových buněk. [41, 42, 43,] Kultivace se provádí za takových podmínek, aby mohly buňky adherovat ke skleněné nebo plastové kultivační láhvi nebo Petriho misce. Ve výzkumu se používají primární buňky, které jsou izolovány přímo z pacientské tkáně nebo se použijí nádorové buněčné linie, které se skladují v mezinárodních buněčných bankách. V případě použití primárních pacientských tkání je potřeba zaměřit se na izolování správného typu buněk, protože tkáň obsahuje různé typy. [42] U nově izolovaných buněčných linií je sledována schopnost proliferace, diferenciaci, exprese specifických povrchových markerů a enzymů, ale i fenotyp a genotyp. Na základě těchto parametrů a dalších testů se získají důležité informace o buněčné biologii, tkáňové morfologii, sekreci cytokinů, produkci konkrétních proteinů, ale také o působení vybraných léčiv na tyto buňky. To znamená, že výběrem nejvhodnější kultivační techniky je možnost co nejvíce porozumět biologii nádoru, a tím optimalizovat léčbu. [42, 43, 44]

V základním výzkumu se používá pro testování látek nádorový model, a to většinou zvířecí nebo lidský, je-li dostupný. Ze zvířecích buněčných linií je to nejčastěji myš, který představuje částečnou podobnost s lidskou fyziologií *in vivo*. [45, 46] Jelikož se u myši málokdy samovolně vytvoří nádory, tak se používají modely geneticky upravených myši, u kterých se tvorba nádoru vyvolá použitím karcinogenů a na základě technologie přenosu genů. Technologie přenosu genů je reverzní přístup, kdy se identifikují cílové geny podílející se na lidském onemocnění za účelem studie genového přenosu u myši. Buď se zavádí exogenní strukturní a regulační genové sekvence do myšního genomu, tzv. transgenní myši, anebo se odstraňují nebo modifikují exprese specifických endogenních myších genů, tzv. knockout myši. [47, 48, 49] Do myších modelů se můžou implantovat nádory pacientů, tzv. modely xenoimplantátů odvozených od pacientů, které jsou vhodné pro studium léčby rakoviny. [47] Všechny tyto myš, nádorové modely sloužily k porozumění mechanismů a léčbě rakoviny žaludku, ke studování karcinogenů a ke studiu experimentální terapie. [48] Ačkoliv tyto zvířecí modely nejbližší odpovídají lidským tkáním, přesto z hlediska rozdílů v genetice

a fyziologii je tendence o vývoj kompletních lidských modelů, které by poskytovaly přesnější výsledky. [45, 46] Nicméně se zvířecí modely pořád používají, a to zejména v toxikologických studiích, [50] v případě nedostatečného množství lidské tkáně pro výzkumné účely nebo jejich náročného získávání a nedostatku znalostí o podmínkách kultivace. [45, 46]

Takto ustanovená primární buněčná kultura roste v monovrstvě, tj. dvourozměrná (2D) kultivační technika, která neznázorňuje přesný model struktury lidských tkání a nádorů *in vivo*. A proto byla snaha vytvořit techniku kultivace, která by se více přiblížila přirozenému uskupení buněk v organismu, tj. trojrozměrná (3D) kultivační technika. Zavedením těchto lidských nádorových modelů se výrazně zlepšuje možnost pochopení lidské genetické různorodosti, iniciace a progresu onemocnění a reakce na léky. To znamená, že práce s buněčnými kulturami se dělí podle použití odlišných kultivačních podmínek. [42, 46]

### **3.1. Dvourozměrná kultivace**

Technika 2D kultivace se používá nejčastěji pro vysoce výkonný screening léčiv a studii toxicity. [51] Výhodou jsou jednoduché a časově nenáročné kultivační protokoly buněčné kultury a levné náklady pro dlouhodobé kultivace. [42] I přestože, že je tato technika hodně používaná, její zásadní nevýhodou je neschopnost napodobit mikroprostředí buněk ve tkáních *in vivo*. [52] Kultivované buňky rostou v monovrstvě, která způsobí plochý a protáhlý tvar buněk a zajistí většině buňkám rovnoměrný přísun živin a růstových faktorů z média. Rovnoměrný přísun živin znamená, že se většina buněk nachází ve stejné fázi buněčného cyklu. [43] Monovrstva je složena převážně z proliferujících buněk, protože nekrotické buňky se samovolně oddělují od povrchů a při pravidelné výměně média dochází k jejich odstranění. [52] Mezi buňkami na počátku každé pasáže nejsou buněčné spoje jako buňka-buňka a buňka-extracelulární matrix, které jsou zodpovědné za buněčnou diferenciaci, proliferaci, vitalitu, expresi genů a proteinů, odezvu na podněty, metabolismus léčiv a další buněčné funkce. V důsledku chybějících buněčných spojů s vnějším prostředím dochází ke ztrátě buněčné polaritě a zároveň dochází ke ztrátě různorodého fenotypu buněk. [42, 53, 54]. Z hlediska metabolismu léčiv se u 2D buněčných kultur pozoruje větší citlivost na léky, která vychází z rozdílné struktury povrchových receptorů na kultivované buňce oproti buňce *in vivo*. Z toho vyplývá, že léky mohou snadno vyvolat apoptózu. Tímto na základě kultivace buněk ve 2D podmínkách dochází ke změnám v buněčné morfologii a buněčném dělení. Změna v morfologii buněk může mít vliv na funkci buněk, organizaci struktur uvnitř buňky, sekreci a buněčnou signalizaci. Navíc 2D kultivační metoda umožňuje studování pouze jednoho buněčného typu, což představuje další nevýhodu. [42, 43]

### 3.2. Trojrozměrná kultivace

Technika 3D kultivace nejpřesněji napodobuje přirozené mikroprostředí buněk ve tkáních *in vivo*. [52] Kultivované buňky rostou do trojrozměrných agregátů, které jsou složeny z více vrstev. Trojrozměrný růst zajišťuje buňkám jejich přirozený tvar, buněčný růst a nerovnoměrný přísun živin a růstových faktorů z média, takže se buňky nachází v různých fázích buněčného cyklu. [43] Agregáty jsou složeny převážně z proliferujících, klidových, apoptických, hypoxických a nekrotických buněk. Vnější vrstva agregátu, která je v přímém spojení s médiem, je složena převážně z životaschopných proliferujících buněk. Zatímco uvnitř agregátu se nachází spíše klidové a hypoxické buňky z důvodu sníženého příjmu kyslíku a růstových faktorů. [52] Buňky mezi sebou interagují na základě buněčných spojení, které se podílí na zachování charakteristického fenotypu a větší rezistenci vůči lékům. Léky jsou lépe metabolizovány, a tudíž nedochází ke snadnému vyvolání apoptózy. Nevýhodou 3D techniky je časová a finanční náročnost. [43, 53]

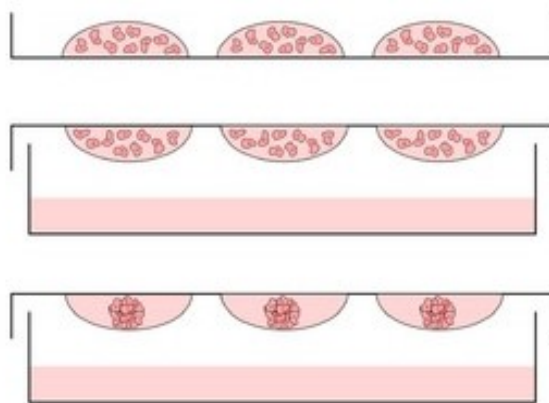
Podle způsobu přípravy se 3D technika rozděluje na tři různé typy. Jako první typem je technika suspenzní kultury, která probíhá v prostředí bez séra a na neadherentních kultivačních miskách, kdy jsou jednotlivé buňky umístěny v tekutém médiu. Vzniklé 3D struktury lze pozorovat po třech dnech kultivace. Výhodou této přípravy je jednoduchost, snadnost, rychlost a buňky se dají snadno namnožit a použít pro další výzkumy. [42, 55] Druhým typem je technika kultury v koncentrovaném tekutém médiu obsahující gelovité látky, kdy jednotlivé buňky rostou v médiu, které obsahuje buď agar, nebo matrigel. Způsob přípravy kultivace se liší na základě výběru gelovité látky. V případě použití agaru se nalije společně agar s médiem do kultivační misky a inkubuje se do té doby, než ztuhne k získání spodní vrstvy. Poté se na spodní vrstvu nalije agar s médiem a jednotlivými buňkami k vytvoření horní vrstvy. Výhodou měkkého agaru je sledování růstu buněk. Nevýhodou je obtížné získávání agregátů pro určité buněčné linie a namnožit buňky z agaru. Zároveň je časově náročná příprava buněčných kultur. V případě použití matrigelu se jednotlivé buňky nanosí na médium v kultivační misce a přelijí se matrigelem. Výhodou matrigelu je snadné namnožení kultivovaných buněk pro další výzkum. Buňky mají trojrozměrné interakce s prostředím, takže vytváří struktury, které jsou podobné tkáním *in vivo*. Nevýhodou je, že matrigel obsahuje endogenní bioaktivní složky, které mají vliv na tvorbu struktury. U této techniky vznikají 3D struktury, které lze pozorovat až po sedmi dnech kultivace. Třetím typem je technika kultury na nosiči, kdy jednotlivé buňky jsou připojeny k tzv. nosiči, který je vyrobený z biologicky odbouratelného materiálu, jako je hedvábí, kolagen, laminin, a alginát. Buňky mohou migrovat

mezi vlákny a nosič podporuje jejich růst a dělení. Nevýhodou je, že se buňky zplošťují a proliferují jako za adherentních podmínek a použitý nosič může ovlivnit adhezi, růst a chování buněk. [42]

Vzniklé agregáty ve 3D kultivaci se liší podle toho, jaký typ buněk se kultivuje a za jakých kultivačních podmínek. Zda potřebují ke kultivaci podpůrnou extracelulární matrix (ECM), což znamená, že jsou buněčné kultury založené na nosiči nebo se kultivují bez ECM. V důsledku toho se vytvářejí různé 3D modely, jako jsou sféroidy a organoidy. [51]

### 3.2.1. Sféroidy

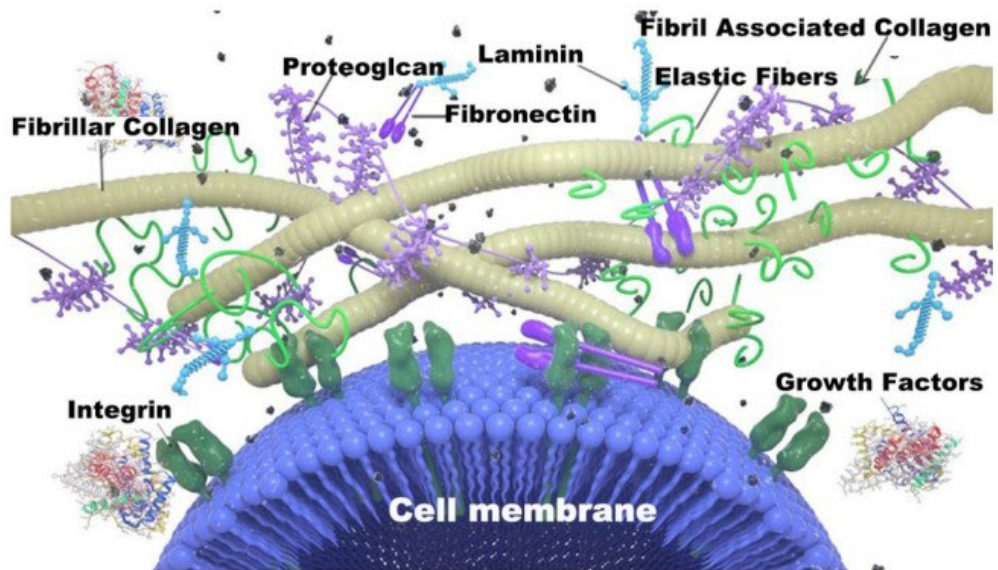
Sféroidy jsou kulovité buněčné jednotky, které se kultivují jako volně plovoucí agregáty a představují menší podobnost s tkání *in vivo*. Ke kultivaci se používají buněčné linie, mnohobuněčné směsi, primární buňky, nádorové buňky a tkáně. Vznikají na základě spontánní agregace buněk prostřednictvím integrinů nacházející se na buněčném povrchu, které zajišťují vazby mezi buňkami. Sféroidy se většinou kultivují bez podpory ECM a vytváří se na základě několik technik. První technika je na základě centrifugace nebo rotace buněčné suspenze, kdy se zamezuje usazování buněk neustálým mícháním za vzniku sféroidů. Odstředivá a rotační síla podporuje adhezi mezi buňkami prostřednictvím integrinů. Nevýhodou této techniky je, že se při velmi vysoké rychlosti míchání mohou vzniklé sféroidy poškodit, a naopak při velmi malé rychlosti se mohou buňky usazovat a sféroidy nevzniknou. [51] Druhá technika je na základě metody visící kapky, která se připravuje napipetováním 20 až 40  $\mu$ l buněčné suspenze na víko Petriho misky. Poté se víko opatrně převrátí a položí na Petriho misku, které obsahuje médium pro zvlhčování atmosféry. Nutné je použití správného typu kultivačního plastu s nízkou přilnavostí, aby buňky nemohly přilnout k povrchu. Tímto následně dochází ke tvorbě shluků v suspenzi za vzniku sféroidů (viz obrázek 6). Tato technika je výhodná v dlouhodobém přežití buněk a zachování jejich fenotypu. [51, 56] Nevýhodou je, že po zahájení kultivace se nemůže vyměnit médium ani sledovat vliv léků během kultivace. [55] Třetí technika se provádí na neadherentním povrchu, kdy se buněčné suspenze nanese na Petriho misku, která má povrch s nízkou přilnavostí nebo je pokrytá agarem, který zabraňuje přilnutí k povrchu. [57, 51] Následně se miska s buněčnou suspenzí umístí na třepačku a neustálé kývání desky přispívá k agregaci buněk za vzniku sféroidů. Výhodou je proveditelnost v 96jamkových destičkách, ale nelze regulovat velikost a tvar sféroidů. [51]



**Obrázek 6:** Metoda na základě visící kapky pro tvorbu sféroidů [56]

### 3.2.2. Organoidy

Organoidy jsou trojrozměrné buněčné kultury, které mají schopnost sebeobnovy, diferenciaci a proliferace. Mohou být vytvořeny z dospělých kmenových buněk primární tkáně, embryonálních kmenových buněk nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk. [5] Tyto buněčné kultury se kultivují ve 3D hydrogelových systémech, které slouží jako nosiče napodobující ECM *in vivo*, která je důležitá pro kultivaci kmenových buněk. [5, 58] ECM je trojrozměrná a nebuněčná struktura, která se nachází ve všech tkáních *in vivo*. [59] Každý typ tkáně má své charakteristické trojrozměrné uspořádání a biochemické složení ECM. [60] Zajišťuje hlavně podpůrnou strukturu buňkám, protože vyplňuje mezibuněčný prostor, a tím se podílí na tvaru buněk. Také se podílí na regulaci buněčných funkcí, jako je adheze, migrace, proliferace a diferenciaci buněk. [61, 62] ECM představuje komplexní síť makromolekul, která je složena z vláknitých a adhezních proteinů a glykoproteinů, jako glykosaminoglykany a proteoglykany. Mezi vláknité proteiny patří kolagen a elastin. [61] Kolagen funguje jako strukturální podpora ECM a kolagenová vlákna zajišťují pevnost v tahu a omezují roztažitelnost tkání. [59, 63] Elastin díky své elasticitě napomáhá udržovat tkáň a orgány fyziologicky funkční z hlediska k jejich natahování a ohýbání. Mezi adhezní proteiny patří fibronectin a laminin. Fibronectin je velký glykoprotein, který je tvořen fibroblasty a nachází se v ECM a na buněčném povrchu v nerozpustné formě. Slouží k vzájemnému připojení buněk k ECM na základě zesílení prostřednictvím disulfidových vazeb a následným uspořádáním do vláken. Laminin je velký glykoprotein, který je součástí bazální membrány a ECM. Buněčná adheze k ECM je zajištěna receptory pro ECM, které se nazývají integriny nacházející se na buněčném povrchu. Integriny zprostředkovávají interakce mezi buňkami navzájem a mezi buňkami s ECM. Podílejí se na komunikaci mezi buňkami, regulaci buněčného cyklu, tvaru buněk a její motilitě (viz obrázek 7). [61]



**Obrázek 7:** Rozvržení složek extracelulární matrix interagující s buněčným povrchem [61]

Hydrogelové systémy jsou na bázi proteinů ECM a nejpoužívanější ECM je matrigel. Matrigel je bazální membrána extrahovaná a purifikovaná z buněk myšního sarkomu a jedná se o želatinovou proteinovou směs, která obsahuje laminin, entaktin, kolagen, proteoglykan a různé růstové faktory. Nicméně matrigel nemá přesně definované všechny složky, které obsahuje a existuje několik rozdílných šarží. Proto je obtížné předpovědět jeho účinek na lidské tělo, a z toho důvodu je snaha prozkoumat jiné alternativy, které nahradí matrigel. [58, 64] Další hydrogelové systémy jsou na bázi přírodních nebo syntetických polymerů a na bázi decelularizovaných tkání. Hydrogely na bázi přírodních polymerů mohou být tvořeny z proteinů, jako je kolagen a fibrin nebo z polysacharidů, jako kyselina hyaluronová, alginát, chitosan a celulóza. [58] Nejvíce se zkoumají hydrogely na bázi kolagenu, které by měly být nejvhodnější pro nahrazení matrigelu, protože kolagen je univerzální složkou proteinů a zároveň je přirozeně obsažen v ECM v živých organismech. Podílí se na podpoře buněčného dělení, migraci a diferenciaci buněk. [58, 64] Z hlediska k náročnému zpracování a složitosti přírodních polymerů byla snaha vytvořit syntetické polymery, jako například polyethylenglykol a polyvinylalkohol. Jenomže hydrogely na bázi syntetických polymerů neznázorňují úplně komplexní ECM *in vivo*. [58]

Hydrogely na bázi decelularizované tkáně se získávají prostřednictvím metody decelularizace, protože je obtížné vytvořit decelulární ECM z jednotlivých molekul. [58, 65] Metoda decelularizace se používá k izolaci ECM od buněk a decelulární ECM se získává z tkání, orgánů a kultivačních buněk. Izolace z tkání nebo orgánů zajišťuje podobné složení



a mikrostrukturu jako ECM *in vivo*. Ačkoliv je výhodou podobnost mezi decelulární ECM a ECM *in vivo*, tak nevýhodou je obtížná identifikace a izolace některých oblastí tkání nebo orgánu pro rekonstrukci ECM. Zároveň je také nedostatečná zásoba vzorků tkání a orgánů, takže se nemůže pracovat s velkoobjemovými metodami. Izolace z již kultivovaných buněk *in vitro* nemusí poskytovat úplně podobné složení a mikrostrukturu jako ECM *in vivo*. Důvodem jsou kultivační podmínky, jako složení média, počáteční substrát, použitý typ buněk a počet pasáží, které mohou pozměnit ECM. Nicméně výhodou je dostatečné množství vzorků kultivovaných buněk. [63]

Decelularizace se rozděluje podle způsobu přípravy do třech metod, a to chemická, fyzikální a enzymatická. V případě chemické metody se používají detergenty, jako je deoxysulfát sodný, Triton X-100 a deoxycholát sodný za účelem solubilizace cytoplazmatické a jaderné lipidové membrány a proteinů. Nevýhodou je, že tyto detergenty mají tendenci narušovat mikrostrukturu ECM a mohou se podílet i na ztrátě složek ECM. Také se používají alkalické a kyselé složky, které solubilizují cytoplazmatické složky a narušují nukleové kyseliny, ale také narušují ECM, protože redukuje glykosaminoglykany. V případě fyzické metody dochází k decelularizaci na základě opakovaných cyklů zmrazování a rozmrazování, které následně rozruší buněčné membrány. Jenomže tyto cykly mohou narušit nebo rozbít strukturu ECM. V případě enzymatické metody se používá trypsin a další proteinázy za účelem degradace proteinů, ale po delším působení dochází k degradaci proteinů ECM, a tudíž se naruší struktura ECM. Také se používají nukleázy k degradaci nukleových kyselin, které nelze degradovat pouze v cytosolových složkách. Všechny tři metody decelularizace mají své výhody a nevýhody, a proto se nejčastěji používá kombinace metod. Pro zkoumání rakovinné ECM v regulaci chování rakovinných buněk je vhodnější izolace ECM z rakovinných tkání. [63]

### **3.3. Techniky pro ustanovení primární linie žaludečních buněk**

Primární linie žaludečních buněk se získávají izolací buněk ze vzorků nádorové a zdravé tkáně. Vzorky tkáně se získávají prostřednictvím biopsie a resekce žaludku nebo nádoru. Po odběru vzorku je nutné tkáň zpracovat co nejdříve pomocí několika technik, aby se získala populace živých a neporušených buněk. Tyto techniky mají za cíl disociovat tkáň a rozdělují se na enzymatické, chemické a mechanické. Výběr techniky záleží na struktuře odebrané tkáně a jednotlivé techniky se mohou kombinovat. [66] Enzymatická technika disociuje tkáň prostřednictvím enzymů, jako je kolagenáza, hyaluronidáza, dispáza, DNáza a trypsin. Většinou se používá kombinace enzymů. Nejpoužívanějším enzymem je kolagenáza

v kombinaci s hyaluronidázou a dispázou. [5, 66, 67] Chemická technika se používá k disociaci mezibuněčných vazeb za účelem jejich uvolnění. Tyto vazby se uvolní odstraněním vápenatých a hořečnatých iontů, které se nachází v buněčné membráně zajišťující integritu buněčného povrchu s intracelulární matrix. K odstraňování těchto iontů se používá kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) a kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA). Obě kyseliny působí podobně a EDTA se používá i během trypsinizace spolu s trypsinem, která slouží k oddělení buněk od dna kultivační nádoby a k narušení adheze mezi buňkami. Mechanická technika desagreguje odebraný vzorek tkáně na malé kousky. Může se provádět manuálně prostřednictvím skalpelu nebo nůžek, pipetování, vortexu nebo aplikováním osmolaritního stresu. Nejvíce se pro desagregaci tkáně používá skalpel nebo nůžky pro získání malých kousků. Pro tuto techniku se mohou použít i nástroje jako je jednorázový desagregátor nebo mikrofluidní zařízení. Mikrofluidní zařízení má pomoci ke zlepšení desagregace tkáně a regenerace buněk, ke zvýšení čistoty vzorku a zkrácení času. Zajišťuje rychlou a jemnou desagregaci s malým použitím enzymů. [66]

V případě izolování dospělých kmenových buněk nacházející se v žaludečních žlázách je nutné po endoskopické resekci nebo biopsii izolovat žlázy. K izolaci žláz se používá fyzický tlak nebo enzymatické techniky. Fyzický tlak znázorňuje techniku, kdy se na tkáň přitiskne sklíčko a přímým tlakem dojde k izolaci neboli uvolnění žláz. Kmenové buňky se mohou izolovat i pomocí průtokové cytometrie. [68]

Ke kultivaci se používá kompletní médium, což je tekutá výživná směs, která je vytvořena ze základního média, séra a růstových faktorů. Základní médium je tvořeno aminokyselinami, vitamíny, ionty a glukózou a poskytuje hlavně výživu buňkám. [69] Aminokyseliny jsou důležité pro kultivaci organoidů a obvykle se přidávají do média tři aminokyseliny: L-glutamin, N-acetylcystein a nikotinamid. L-glutamin je esenciální aminokyselina, která slouží jako zdroj energie pro kultivované buňky a je důležitá pro růst buněk. Zároveň se podílí na syntéze proteinů a metabolismu nukleových kyselin. Nicméně pro poskytnutí lepší stability a podpory zdraví buňkám je používána alternativa k L-glutaminu, a tím je glutamax. N-acetylcystein je účinný antioxidant, který vylučuje volné radikály za účelem ochrany buněk před oxidačním poškozením. Nikotinamid je vitamín B3, který se podílí hlavně na fyziologii buněk. [70] Jako sérum se používá fetální bovinní sérum (FBS), které se získává z krve bovinního plodu a představuje přirozenou směs obsahující všechny potřebné základní proteiny, růstové faktory a hormony. FBS je důležité pro zachování buněčného přežití, růstu a proliferace. Růstové faktory se přidávají do média za účelem regulace

proliferace a diferenciaci buněk do konkrétní buněčné linie. [69] Jedná se o epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF), protein Noggin, R-spondin-1 a Wnt-3a, gastrin, inhibitor A83-01 a SB202190. [70, 71] EGF má zásadní vliv na buněčný růst, proliferaci a diferenciaci. FGF podporuje hlavně buněčnou mitózu. Noggin je důležitým proteinem pro kmenové buňky a používá se pro dlouhodobou kultivaci organoidů. R-spondin-1 se podílí na aktivaci proteinu Wnt-3a, který ovlivňuje hlavně kmenové a progenitorové buňky. A83-01 je inhibitor receptoru transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ), který podporuje buněčnou proliferaci. SB202190 je inhibitor proteinkinázy aktivované mitogenem p38, který podporuje tvorbu organoidů. [70] Médium se při kultivaci pravidelně obměňuje z důvodu zachování neustálého přísunu živin a růstových faktorů a odstranění odpadních produktů vyloučené buňkami. [69]

Vytvořené lidské žaludeční organoidy se udržují na základě toho, jaké buňky se izolovaly. V případě izolování diferencovaných buněk, většinou mukózních, se organoidy mohou udržovat pouze několik dní, protože nemají schopnost sebeobnovy. V případě izolování kmenových buněk se organoidy mohou udržovat déle než rok, protože kmenové buňky mají schopnost sebeobnovy, jsou dlouhověké a multipotentní. Tyto všechny vlastnosti kmenových buněk jsou výhodné pro tvorbu kvalitních organoidů, a to zejména jejich schopnost diferenciaci do všech buněčných typů. [72]

## 4. LABORATORNÍ IZOLACE A KULTIVACE ŽALUDEČNÍCH BUNĚK

### 4.1. Postupy pro zpracování vzorku ze zdravé tkáně

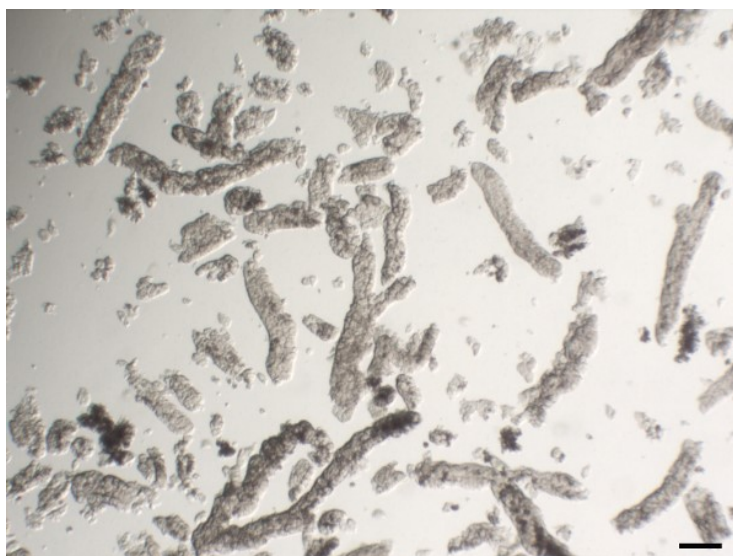
Vzorky ze zdravé tkáně jsou získány pomocí endoskopické biopsie nebo resekce žaludku. Ke zpracování je potřeba odebrat přibližně 1 cm<sup>2</sup> vzorek tkáně, který se vkládá do studeného bazálního média a ponechává se na ledu do té doby, než se s ním začne pracovat. [54] Takto uchované vzorky by se měly zpracovat do 3 hodin po jejich získání. [73] Poté se připraví základní matrix, která se připravuje podle výrobce a používá se matrigel, který se musí udržovat na ledě při 4 °C, protože dokáže ztuhnout i při pokojové teplotě. Pokud je předpřipravený, tak se před použitím musí nechat rozmrazit na ledu, protože se skladuje při -20 °C. [7, 54] Připraví se bazální médium, které se chladí na ledu a používá se nejčastěji DMEM/F12 (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium), které je doplněné pufovacím činidlem HEPES, zdrojem glutaminu glutamax a vhodnými antibiotiky jako je primocin. [54] V jiných studiích se používají jiná antibiotika, a to směs penicilinu a streptomycinu. [72] Ještě se připravuje chelatační pufr, který se také chladí na ledu. Nejvhodnější je používání menších objemů pro přípravu všech přípravků, aby se zamezilo opakovanému zmrazování a rozmrazování. [54]

Odebraný vzorek tkáně je přenesen na Petriho misku, kde je následně promýván různými promývacími prostředky. V jedné studii používají studený chelatační pufr, ve druhé studený Hankův pufovaný fyziologický roztok (HBSS) a ve třetí Dulbecco's fyziologický roztok pufovaný fosfátem (DPBS), který je doplněný směsí antibiotik (penicilin, streptomycin a primocin). [54, 73, 74] Z promyté tkáně se vždy opatrně odstraní pomocí kleští nebo nůžek hlen, tuková tkáň, krevní cévy a svalová vrstva pod stereomikroskopem a následně se znovu promyje v daném promývacím prostředku. [72, 74, 75] Promytá tkáň se nastříhá nůžkami na 20-50 malých kousků o velikosti přibližně 2-5 mm<sup>2</sup>. Všechny kousky se pomocí kleští vloží do zkumavky a přidá se k nim 10 ml studeného chelatačního pufru. Kousky ve zkumavce se promyjí opakovaným pipetováním nahoru a dolů, a to 10krát. Poté se nechají kousky usadit a odstraní se supernatant. Přidá se znovu 10 ml studeného chelatačního pufru a promývání se opakuje do té doby, než supernatant bude zcela čirý. [54]

Ve srovnání s jinými studiemi jsou i jiné možnosti. Buď jsou nastříhané kousky tkáně promyty 8 až 10krát ve studeném HBBS do té doby, než bude supernatant čirý [73], anebo

jsou nastříhané kousky vloženy do zkumavky se studeným chelatačním pufrům a zkumavka je šokována v ledové lázni na hodinu za účelem rozpadnutí tkáně. [74]

Po odstranění čirého supernatantu následuje inkubace, kdy se přidá 20 ml chelatačního pufru, které je doplněné 10 mM EDTA a nechá se inkubovat buď při teplotě místnosti po dobu 10 minut, během kterých se každé 2 minuty jemně převrátí zkumavka [54], anebo při 37 °C po dobu 30 minut na třepací plošině. [73] Ve většině studií se po uběhlé inkubaci promíchají kousky, nechají se usadit a odstraní se supernatant. Kousky tkáně se přemístují do Petriho misky, přiloží se na ně mikroskopické sklíčko a můžeme sledovat tkáň s neporušenými žlázami pod mikroskopem. Poté se mikroskopické sklíčko přitlačí k misce a způsobeným tlakem dojde k uvolnění žaludečních žláz, které se projeví zakalením okraje tkáně. [72] Uvolněné žlázy se pozorují pod inverzním mikroskopem s 10násobným zvětšením (viz obrázek 8). [54]



**Obrázek 8:** Izolované lidské žlázy pod inverzním mikroskopem [54]

Izolované žlázy jsou resuspendované ve studeném bazálním médiu DMEM/F12 a velké fragmenty tkáně se nechají usadit. Odebere se zakalený supernatant obsahující žlázy do dvou zkumavek a centrifugují se 5 minut při 200x g a teplotě 4 °C. [72] Ve dvou studiích použili stejné bazální médium DMEM/F12, ale doplněné o 10% FBS a zároveň se lišil počet promývání a centrifugace. V jedné studii se izolované žlázy 5krát promývaly před centrifugací a poté se ještě 3krát promývaly médiem DMEM/F12. [73] Ve druhé studii probíhala centrifugace při 300x g a poté byly žlázy 2krát promyté a následně se štěpily pomocí enzymu trypsinu při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. [74] Po centrifugaci se odstraní supernatant a ve zkumavkách zůstanou pelety obsahující izolované žlázy, které se umístí na led. [54] Struktura uvolněných žláz se většinou během promývání mění a můžou být viditelné i jednotlivé buňky. [72]

Takto izolované žlázy jsou připraveny ke kultivaci a existují různé protokoly pro vytvoření organoidů. Nejvíce se v protokolech používá pro naočkování žláz matrigel a odlišují se ve složení růstových faktorů. [71] Pro naočkování žláz jsou dvě možnosti. První možností je pomocí ředící řady, kdy se peleta izolovaných žláz resuspenduje v 60  $\mu$ l matrigelu. Poté se připraví pět sterilních mikrozkušavek, do kterých se napipetuje 50  $\mu$ l matrigelu a jsou uloženy na ledě. Do první mikrozkušavky se napipetuje 10  $\mu$ l resuspendovaných žláz v matrigelu, pomocí pipety se žlázy suspendují a přenesou se dalších 10  $\mu$ l do druhé mikrozkušavky. Stejným způsobem se pokračuje až do páté mikrozkušavky, ze které se 10  $\mu$ l odstraní. [54]

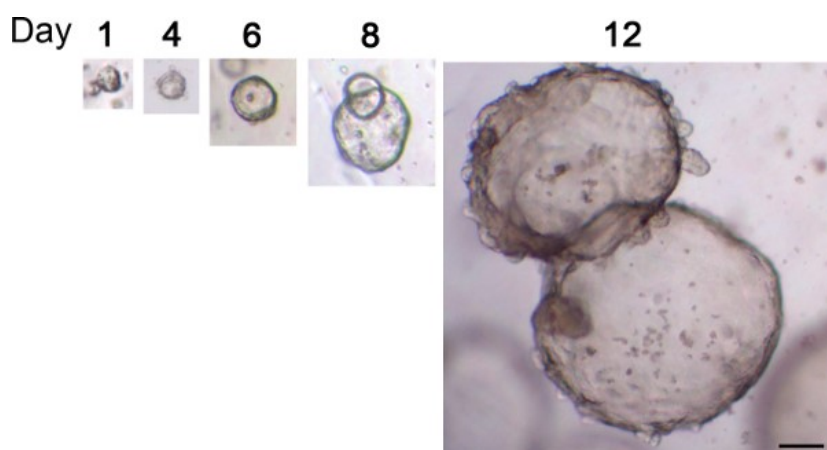
Druhou možností je naočkování spočítaného množství žláz, kdy se peleta izolovaných žláz resuspenduje v 10 ml bazálního média. Poté se napipetuje 50  $\mu$ l na Petriho misku, která se vloží pod inverzní mikroskop a spočítají se žlázy a vypočítá se koncentrace žláz v roztoku. Následně se přenesou do nové 15 ml zkumavky takový objem roztoku, který obsahuje 400 žlázek a dá se centrifugovat na 5 minut při 200x g a teplotě 4 °C. Odebere se supernatant a zkumavka se nechá na ledě, do které se přidá 200  $\mu$ l matrigelu a jemně se resuspenduje. [54] Z obou možností se připravily hotové roztoky pro naočkování do 24jamkové destičky, která se vyndá z inkubátoru, kde se den předem inkubovala při teplotě 37 °C. Do každé jamky se napipetuje 50  $\mu$ l žlázek a vytvoří se kapka. Po napipetování do všech 5 jamek se opatrně destička vrátí do inkubátoru na 10 minut za účelem ztuhnutí matrigelu. [72]

V jedné výzkumné studii používali v protokolu také matrigel a použili 5 různých kultivačních médií pro získání informací ohledně potřeb jednotlivých růstových faktorů. První kultivační médium bylo médium DMEM/F12 s 10% FBS, penicilem a streptomycinem, glutamaxem a s pufovacím činidlem HEPES. Druhé kultivační médium bylo DMEM/F12 s penicilem a streptomycinem, glutamaxem a s pufovacím činidlem HEPES. [74] Ještě se přidal doplněk B27 a N-2, které jsou vhodné pro kultury kmenových buněk [70, 74] Třetí kultivační médium bylo stejné jako druhé, ke kterému se navíc přidal Noggin a EGF. Čtvrté médium bylo stejné také jako druhé, které navíc obsahovalo N-acetylcystein, EGF, Noggin, FGF, gastrin, primocin, nikotinamid a inhibitor A83-01. Páté kultivační médium bylo stejné jako čtvrté, ke kterému se přidal R-spondin-1 a Wnt3a. Z těchto pokusů se použitá kultivační média lišila hlavně v rychlosti proliferace buněk. Ukázalo se, že v prvním, druhém a třetím kultivačním médiu buňky neudržely normální růst. Zatímco ve čtvrtém kultivačním médiu buňky mohly tvořit monokolonie a v pátém se tvořilo více kolonií o průměru až 100  $\mu$ m. Z toho vyplývá, že pro kultivaci je nejvhodnější páté médium. [74]

Po uplynutí inkubace se připraví teplé kompletní bazální médium se všemi růstovými faktory pro lidské žaludeční organoidy. Do každé jamky se opatrně napipetuje 500  $\mu$ l bazálního média tak, aby se neporušil ztuhlý matrigel se žlázy. Poté se znovu vrátí do inkubátoru. Po 2 až 3 dnech se staré bazální médium vyměňuje za čerstvé teplé médium [72] bez inhibitoru SB202190, který se používá po naočkování žláz do matrigelu nebo po rozštěpení organoidů. Při odstraňování média se dává pozor, aby se neporušila matrix. [54]

Pro tvorbu žaludečních organoidů v jiném protokolu použili místo matrigelu kolagen a použili techniku rozhraní vzduch-kapalina (ALI). Při této technice se buňky umístily na hydrofilní polytetrafluorethylenovou membránu, která byla ve spodní části pokryta roztokem kolagenu. Poté bylo přidáno na dno kultivační médium tak, aby buňky nebyly ponořeny. Tímto bylo zajištěno, že horní vrstva buněk byla přímo vystavena vzduchu a zároveň spodní vrstva buněk udržovala kontakt s médiem. [71] Dokonce bylo možné kultivovat organoidy se samostatným fetálním telecím sérem (FCS), který byl doplněn růstovým faktorem R-spondin-1 pro zlepšení proliferace. [76]

Během kultivace lidských žaludečních žláz v inkubátoru se žlázy spojují a uzavírají za účelem vytvoření malých cyst, které se následně množí. Takto vytvořené stejné organoidy se pozorovaly pod mikroskopem (viz obrázek 9). [54, 72]



**Obrázek 9:** Typický růst stejného žaludečního organoidu po dobu 12 dní [54]

Po vytvoření organoidů, které narostly do velikosti 100  $\mu$ m, následuje pasáž organoidních kultur, [77] které se provádí každých 14 dní. [72] Z jamek se odstraňuje bazální médium za čerstvé a studené DMEM/F12. Pomocí mikropipety se intenzivním pipetováním rozbije matrigel s organoidy a přenesou se do nové zkumavky, [72, 73] která je umístěna na ledu. [54] Ve studiích se pasážování organoidních kultur provádí prostřednictvím dvou technik [75] za účelem získání menších shluků 3-5 buněk. [77] První technika je na základě

manuálního rozbití organoidů pomocí zúžené pipety a druhá technika je na základě enzymatické disociace. [75] Technika manuálního rozbití organoidů pomocí zúžené pipety znamená, že se použila pipeta, která měla otvor zúžený přibližně na 0,5 mm. [54] K organoidům ve zkumavce se přidalo studené bazální médium DMEM/F12 a opakovaným pipetováním zúženou pausterovou pipetou docházelo k jejich postupnému rozbití na menší shluky buněk. [72, 77] Poté se zkumavka s rozbitými organoidy centrifugovala na 5 minut při 200x g a teplotě 4 °C. Po centrifugaci se odstranil supernatant a peleta se resuspendovala v matrigelu na ledě. Takto byl připravený roztok pro naočkování do jamkové destičky. [72] V jiné studii byla nejprve promyta zkumavka s rozbitým matrigelem a organoidy ve studeném médiu DMEM/F12 a centrifugována na 5 minut při 200x g a teplotě 4 °C. Poté byla vzniklá peleta resuspendovaná ve stejném studeném médiu a organoidy se rozbily použitím zúžené skleněné pipety. Skleněná pipeta musela být potažená 1% hovězím sérovým albuminem (BSA) ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem (PBS), a to z důvodu zabránění adheze organoidů ke sklu. [75]

Technika enzymatické disociace je stejná v promývání, rozbití organoidů a centrifugaci jako technika manuálního rozbití organoidů. Rozdílem je zpracování vzniklé pelety, která je resuspendovaná s trypsinem a inkubuje se 5 minut při teplotě 37 °C. [73, 75] Po inkubaci se organoidy přenesly do zkumavky, ke kterým se přidalo studené bazální médium za účelem inaktivace trypsinu. Zkumavka se centrifugovala, supernatant se odstranil a vzniklá peleta byla resuspendovaná v matrigelu pro naočkování. [75] V jiné studii použili pro inaktivaci trypsinu studené bazální médium s 10% FCS. [73] Tato technika se používá pro rychlé namnožení organoidů, protože disociované progenitorové buňky mají větší schopnost vytvářet nové organoidy. [75]

## **4.2. Postupy pro zpracování vzorku z nádorové tkáně**

Vzorky nádorové tkáně se získávají z endoskopických biopsií nebo chirurgických resekcí žaludku. Postup pro zpracování nádorového vzorku je podobný jako pro zdravou tkáň. Jako promývací prostředek se většinou používal chelatační pufr [72] nebo PBS. [77] Většinou se liší v tom, že nastříhané nádorové kousky tkáně jsou enzymaticky štěpeny. [78] Pro enzymatické štěpení existují různé protokoly, které používají většinou kombinace enzymů. [79] Nádorové kousky tkáně se mohly štěpit pouze kolagenázou po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C [80] nebo se štěpily pomocí kolagenázy a hyaluronidázy a inkubace probíhala podobně po dobu 1 až 2 hodiny při stejné teplotě a občas se zkumavka jemně protřepala. [78] V dalších protokolech používali jiné kombinace jako je dispáza a kolagenáza, liberáza a trypsin nebo trypsin s EDTA. [79]

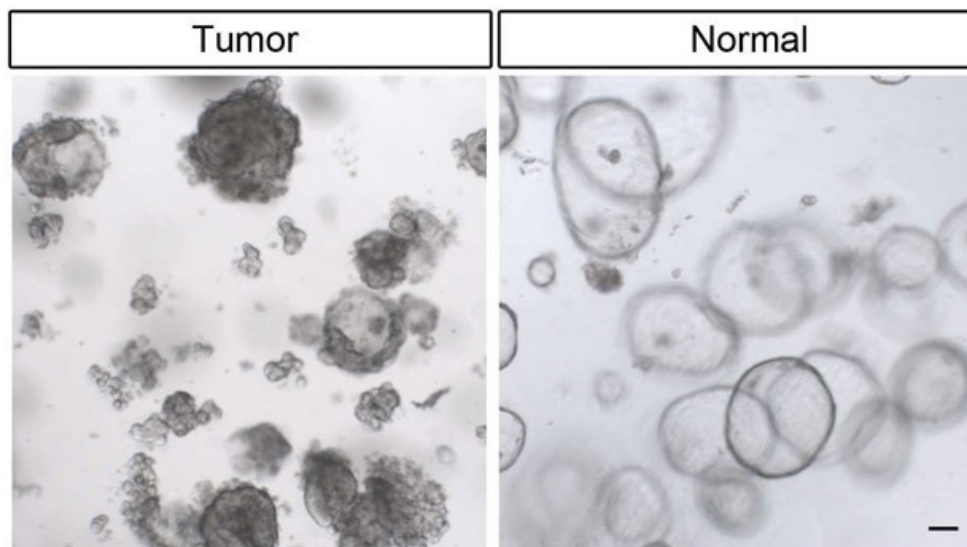


Vznikly studie, ve kterých se pro kultivaci rakovinných buněk použilo kultivační médium DMEM/F12 s 2,5% FBS místo s 10% FBS. [77, 81] Médium bylo doplněno všemi růstovými faktory stejně jako u zdravých buněk. Přidalo se buď 50% Wnt3a s 10% R-spondin-1, [79] anebo s 20% R-spondin-1. [81] Zároveň se také místo média DMEM/F12 použilo jiné médium, a to RPMI-1640 (médium Roswell Park Memorial Institute), které bylo doplněno 10% FBS. [82, 83] Kromě uvedených postupů pro inkubaci zdravé tkáně probíhala inkubace s trávicími enzymy přibližně 40 minut při teplotě 37 °C na třepačce. Postupné štěpení tkáně se pozorovalo a po zredukování tkáně na polovinu [77] se disociovaná tkáň přefiltrovala přes 70 µm buněčné síto a promyla do nové zkumavky. [78] Zkumavka se centrifugovala na 4 minuty při 400x g a teplotě 4 °C a supernatant se odstranil. [77] Vzniklá peleta byla připravena k naočkování do matrigelu za vzniku nádorových organoidů. [78]

V jedné výzkumné studii použili pro kultivaci rakovinných buněk místo matrigelu nosič zvaný Cellbed, což je vysoce čistý křemičitý vláknitý agregát s ultrajemnou pórovitostí a je vyrobený amalgamací vytvořených vláken oxidu křemičitého. Jeho struktura je podobná mřížce připomínající volné pojivové tkáně v organismu. Cellbed sice podporuje vlastnosti rakovinných buněk, ale během kultivace se nevytvoří příslušné žlázoové struktury. [84]

Pasážování nádorových organoidů je většinou podobný jako u zdravých organoidů. [72] Většinou se používá technika enzymatické disociace. V jednom protokolu se pasáž lišila tím, že přidali do zkumavky s rozbitými organoidy nejen studené bazální médium DMEM/F12, ale i vhodné množství PBS. Rozdílne probíhala i centrifugace, a to 4 minuty při 400x g a teplotě 4 °C. [77]

Nevýhodou resekce nádorové tkáně je odběr i přilehlé zdravé tkáně a při kultivaci je možné získat směs jak nádorových, tak normálních organoidů. V tomto případě se můžou směsi rozdělit za účelem získání jednotných organoidů, a to na základě manuálního výběru podle morfologie organoidů. Normální organoidy mají podobu cystických struktur a lumen, kdežto nádorové organoidy mají nepravidelný tvar a většinou heterogenní zvrásněné buněčné vrstvy (viz obrázek 10). [78]



**Obrázek 10:** Morfologie nádorového a normálního organoidu [78]

## 5. VYUŽITÍ LIDSKÝCH ŽALUDEČNÍCH MODELŮ

Modely 2D buněčné kultury mají omezenou proliferační schopnost většinou jen na 2 týdny *in vitro*. [73] Nejvíce se využívají při objevování nových léků. [43] Lze je využít i pro studium buněčných odpovědí na ionizující záření nebo na expozici chemoterapeutikům. [42]

Nejvíce se využívají 3D modely, díky kterým je možné studovat nádorovou biologii, mezibuněčné interakce, mikroprostředí a genotyp. Sféroidy mají také omezenou proliferační schopnost, která je způsobená buněčným dělením. [73] Sféroidy se používají pro studium buněčné migrace na ECM [42] a nádorové sféroidy se využívají pro testování léků před jejich klinickou aplikací. [85] Zdravé organoidy se nejvíce využívají pro studium bakterie *Helicobacter pylori*, kdy se do zdravých organoidů vpravují bakterie pomocí mikroinjekce a sleduje se reakce lidského organoidu na bakterii. [72] Kultivace nádorových organoidů má zásadní význam v oblasti onkologického výzkumu, a to při vývoji individuální imunoterapie a vývoj nových léčiv. [68] V blízké budoucnosti se vyvíjí možnost použití lidských žaludečních organoidů pro transplantace orgánu. Potřeba transplantovaných orgánů přibývá a z důvodu rejekce štěpů a nedostatku dárců by organoidy byly nejvhodnější autologní transplantační terapií. [79, 86] Nevýhodou je velikost organoidů, které jsou v průměru 2 až 3 mm, kdežto žaludek je ve velikosti 10 cm x 30 cm. [79] Tento problém je způsobený tím, že současné modely organoidů nemají dobře vyvinutý vaskulární systém, a proto je nelze kultivovat ve větší velikosti. Tudíž je snaha se podílet na vývoji vaskularizace za účelem kultivovat organoidy ve větší velikosti. [68]

Všechny vytvořené modely organoidů se shromažďují pro účelné studie v mezinárodní buněčné bance. V této bance jsou uloženy primární buňky izolované od patientských dárců a zavedené buněčné kultury. [42]

## ZÁVĚR

Cílem kultivace lidských buněk je vytvoření co nejpřesnějších lidských zdravých a nádorových modelů *in vitro*, které by znázorňovaly lidskou tkáň a nádorové mikroprostředí *in vivo*. Existují různé studie, jak postupovat při zpracování lidské tkáně a při jakých kultivačních podmínkách mohou proliferovat. Během několika výzkumných studií se podařilo vytvořit organoidy z kmenových buněk za účelem vzniku dlouhodobé 3D buněčné kultury, která by proliferovala déle než 1 rok.

Z hlediska vysoké úmrtnosti na rakovinu žaludku jsou organoidy potřebné pro odhalení genetických příčin, pochopení mechanismu, předcházení a včasnému rozpoznání rakoviny. K tomu slouží i organoidy, které jsou vytvořeny izolací od konkrétních pacientů za účelem nastavení individuální terapie a zároveň k optimalizaci průběhu léčby.

Tvorba organoidů je finančně i časově náročná, ale díky nim se získávají potřebné informace o fyziologických a nádorových žaludečních mechanismech. V blízké budoucnosti by se měly provádět další výzkumné studie organoidů za účelem vyvíjení ještě přesnějších modelů orgánu, modelů rakoviny a také pro transplantaci orgánu.

## SEZNAM ZDROJŮ

- [1] BUSSLINGER, G. A., B. L. A. WEUSTEN, A. BOGTE, H. BEGTHEL, L. A. A. BROSENS a H. CLEVERS. Human gastrointestinal epithelia of the esophagus, stomach, and duodenum resolved at single-cell resolution. *Cell Reports*. 2021, 34(10): 108819, 1-17.e6 [cit. 2022-12-08].
- [2] HUNT, R. H., M. CAMILLERI, S. E. CROWE, E. M. EL-OMAR, J. G. FOX, E. J. KUIPERS, P. MALFERTHEINER, K. E. L. MCCOLL, D. M. PRITCHARD, M. RUGGE, A. SONNENBERG, K. SUGANO, J. TACK. The stomach in health and disease. *Gut*. 2015, 64(10), 1650-1668 [cit. 2022-12-08]
- [3] KASSIR, R., P. BLANC, P. LOINTIER, O. TIFFET, CH. BRETON, I. B. AMOR, A. IANNELLI a J. GUGENHEIM. An analysis of surgical anatomy of the gastric fundus in bariatric surgery: Why the gastric pouch expands? A point of technique. *International Journal of Surgery*. 2014, 12(11), 1151-1156 [cit. 2022-12-10].
- [4] ENGEVIK, A. C., I. KAJI a J. R. GOLDENRING. The Physiology of the Gastric Parietal Cell. *Physiological Reviews*. 2020, 100(2), 573-602 [cit. 2022-12-10].
- [5] SEIDLITZ, T., B.-K. KOO a D. E. STANGE. Gastric organoids-an in vitro model system for the study of gastric development and road to personalized medicine. *Cell Death and Differentiation*. 2021, 28(1), 68-83 [cit. 2023-03-09].
- [6] GOYAL, R. K., Y. GUO a H. MASHIMO. Advances in the physiology of gastric emptying. *Neurogastroenterology and Motility*. 2019, 31(4): 13546, 1-14 [cit. 2022-12-11].
- [7] BRODA, T. R., K. W. MCCRACKEN a J. M. WELLS. Generation of human antral and fundic gastric organoids from pluripotent stem cells. *Nature Protocols*. 2019, 14(1), 28-50 [cit. 2022-12-10].
- [8] KIM, J., J. AHN, G. KANG, J. H. HWANG a CH. KIM. High-resolution photoacoustic/ultrasound imaging of the porcine stomach wall: an ex vivo feasibility study. *Biomedical Optics Express*. 2021, 12(11), 6717-6729 [cit. 2022-12-12].
- [9] CAMPOS, N. M. F., V. ALMEIDA a L. C. SEMEDO. Peritoneal disease: key imaging findings that help in the differential diagnosis. *The British Journal of Radiology*. 2022, 95(1130): 20210346, 1-12 [cit. 2023-03-10].

- [10] ZAGAMI, C., D. PAPP, A. A. DADDI a F. BOCCELLATO. Morphogen Signals Shaping the Gastric Glands in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23(7): 3632, 1-20 [cit. 2022-12-13].
- [11] SÁENZ, J. B. a J. C. MILLS. Acid and the basis for cellular plasticity and reprogramming in gastric repair and cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2018, 15(5), 257-273 [cit. 2022-12-20].
- [12] UCHIYAMA, S., N. SAEKI a K. OGAWA. Aberrant EphB/ephrin-B expression in experimental gastric lesions and tumor cells. *World Journal of Gastroenterology*. 2015, 21(2), 453-464 [cit. 2023-03-10].
- [13] NI, X., Z. TAN, Ch. DING, CH. ZHANG, L. SONG, S. YANG, M. LIU, R. JIA, CH. ZHAO, L. SONG, W. LIU, Q. ZHOU, T. GONG, X. LI, Y. TAI, W. ZHU, T. SHI, Y. WANG, J. XU, B. ZHEN a J. QIN. A region-resolved mucosa proteome of the human stomach. *Nature Communications*. 2019, 10(1): 39, 1-11 [cit. 2022-12-16].
- [14] LU, S.-Y., S. GUO, S.-B. CHAI, J.-Q. YANG, Y. YUE, H. LI, P.-M. SUN, T. ZHANG, H.-W. SUN, J.-L. ZHOU, J.-W. YANG, H.-M. YANG, Z.-P. LI a Y. CUI. Autophagy in Gastric Mucosa: The Dual Role and Potential Therapeutic Target. *BioMed Research International*. 2021, 2021: 2648065, 1-8 [cit. 2022-12-16].
- [15] NIE, S. a Y. YUAN. The Role of Gastric Mucosal Immunity in Gastric Diseases. *Journal of Immunology Research*. 2020, 2020: 7927054, 1-8 [cit. 2022-12-16].
- [16] LIU, S., Z. DENG, J. ZHU, Z. MA, B. TUO, T. LI a X. LIU. Gastric immune homeostasis imbalance: An important factor in the development of gastric mucosal diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2023, 161(114338), 1-11 [cit. 2023-04-04].
- [17] GULLO, I., F. GRILLO, L. MASTRACCI, A. VANOLI, F. CARNEIRO, L. SARAGONI, F. LIMARZI, J. FERRO, P. PARENTE a M. FASSAN. Precancerous lesions of the stomach, gastric cancer and hereditary gastric cancer syndromes. *Pathologica*. 2020, 112(3), 166-185 [cit. 2023-03-15].
- [18] CRAFA, P., M. RUSSO, CH. MIRAGLIA, A. BARCHI, F. MOCCIA, A. NOUVENNE, G. LEANDRO, T. MESCHI, G. L. DE'ANGELIS a F. D. MARIO. From Sidney to OLGA: an overview of atrophic gastritis. *Acta Biomedica*. 2018, 89(8-S), 93-99 [cit. 2023-04-07].

- [19] ZHAO, Y., Z. DENG, Z. MA, M. ZHANG, H. WANG, B. TUO, T. LI a X. LIU. Expression alteration and dysfunction of ion channels/transporters in the parietal cells induces gastric diffused mucosal injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022, 148: 112660, 1-7 [cit. 2022-12-18].
- [20] GOLDENRING, J. R. a J. C. MILLS. Cellular Plasticity, Reprogramming, and Regeneration: Metaplasia in the Stomach and Beyond. *Gastroenterology*. 2022, 162(2), 415-430 [cit. 2023-03-14].
- [21] DENG, Z., J. ZHU, Z. MA, Z. YI, B. TUO, T. LI a X. LIU. The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on initial chief cell loss as a key target. *Cell Death Discovery*. 2023, 9(1): 29, 1-4 [cit. 2023-03-14].
- [22] WANG, Y., L. SHEN, G. ZHAO, B. LI, J. BU, CH. ZHU, B. JIANG a S. WANG. Histomorphological Characteristics and Pathological Types of Hyperproliferation of Gastric Surface Epithelial Cells. *Gastroenterology Research and Practice*. 2021, 2021: 8828326, 1-11 [cit. 2023-03-14].
- [23] KIM, G. H. Proton Pump Inhibitor-Related Gastric Mucosal Changes. *Gut and Liver*. 2021, 15(5), 646-652 [cit. 2023-03-26].
- [24] HELGADOTTIR, H. a E. S. BJORNSSON. Problems Associated with Deprescribing of Proton Pump Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(21): 5469, 1-17 [cit. 2023-04-09].
- [25] MARKOWSKI, A. R., A. MARKOWSKA a K. GUZINSKA-USTYMOWICZ. Pathophysiological and clinical aspects of gastric hyperplastic polyps. *World Journal of Gastroenterology*. 2016, 22(40), 8883-8891 [cit. 2023-03-16].
- [26] SHAIB, Y. H., M. RUGGE, D. Y. GRAHAM a R. M. GENTA. Management of Gastric Polyps: An Endoscopy-Based Approach. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2013, 11(11), 1374-1384 [cit. 2023-04-16].
- [27] WALDUM, H. a R. FOSSMARK. Gastritis, Gastric Polyps and Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(12): 6548, 1-14 [cit. 2023-03-16].
- [28] VOS, S., R. S. VAN DER POST a L. A. A. BROSENS. Gastric Epithelial Polyps: When to Ponder, When to Panic. *Surgical Pathology Clinics*. 2020, 13(3), 431-452 [cit. 2023-03-16].

- [29] BUSINELLO, G., V. ANGERILLI, P. PARENTE, S. REALDON, E. SAVARINO, F. FARINATI, F. GRILLO, A. VANOLI, F. GALUPPINI, S. PACCAGNELLA, G. PENNELLI, L. MASTRACCI, L. SARAGONI a M. FASSAN. Molecular Landscapes of Gastric Pre-Neoplastic and Pre-Invasive Lesions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(18): 9950, 1-17 [cit. 2023-04-17].
- [30] WATARI, J., N. CHEN, P. S. AMENTA, H. FUKUI, T. OSHIMA, T. TOMITA, H. MIWA, K.-J. LIM a K. M. DAS. Helicobacter pylori associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, 20(18), 5461-5473 [cit. 2023-03-26].
- [31] JAROENLAPNOPPARAT, A., K. BHATIA a S. COBAN. Inflammation and Gastric Cancer. *Diseases*. 2022, 10(3): 35, 1-25 [cit. 2023-04-10].
- [32] YANG, H., W.-J. YANG a B. HU. Gastric epithelial histology and precancerous conditions. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2022, 14(2), 396-412 [cit. 2023-03-26].
- [33] SHAH, S. C., M. B. PIAZUELO, E. J. KUIPERS a D. LI. AGA Clinical Practice Update on the Diagnosis and Management of Atrophic Gastritis: Expert Review. *Gastroenterology*. 2021, 161(4), 1325-1332.e7 [cit. 2023-03-27].
- [34] GIROUX, V. a A. K. RUSTGI. Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia – cancer sequence. *Nature Reviews Cancer*. 2017, 17(10), 594-604 [cit. 2023-04-11].
- [35] HUANG, R. J., A. Y. CHOI, C. D. TRUONG, M. M. YEH a J. H. HWANG. Diagnosis and Management of Gastric Intestinal Metaplasia: Current Status and Future Directions. *Gut and Liver*. 2019, 13(6), 596-603 [cit. 2023-03-16].
- [36] BATTISTA, S., M. R. AMBROSIO, F. LIMARZI, G. GALLO a L. SARAGONI. Molecular Alterations in Gastric Preneoplastic Lesions and Early Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(13): 6652, 1-10 [cit. 2023-04-12].
- [37] PIAZUELO, M. B. a P. CORREA. Gastric cáncer: Overview. *Colombia Médica*. 2013, 44(3), 192-201 [cit. 2023-04-13].
- [38] WALDUM, H. a P. G. MJØNES. Correct Identification of Cell of Origin May Explain Many Aspects of Cancer: The Role of Neuroendocrine Cells as Exemplified from the Stomach. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(16): 5751, 1-12 [cit. 2023-04-17].



- [39] WALDUM, H. L. a R. FOSSMARK. Types of Gastric Carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(12): 4109, 1-12 [cit. 2023-04-14].
- [40] PISCIONE, M., M. MAZZONE, M. C. DI MARCANTONIO, R. MURARO a G. MINCIONE. Eradication of *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: A Controversial Relationship. *Frontiers in Microbiology*. 2021, 12: 630852, 1-18 [cit. 2023-04-11].
- [41] SEENEEVASSEN, L., E. BESSÈDE, F. MÉGRAUD, P. LEHOURS, P. DUBUS a CH. VARON. Gastric Cancer: Advances in Carcinogenesis Research and New Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(7): 3418, 1-25 [cit. 2023-05-01].
- [42] KAPAŁCZYŃSKA, M., T. KOLENDA, W. PRZYBYŁA, M. ZAJĄCZKOWSKA, A. TERESIAK, V. FILAS, M. IBBS, R. BLIŹNIAK, Ł. ŁUCZEWSKI a K. LAMPERSKA. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. 2018, 14(4), 910-919 [cit. 2023-05-01].
- [43] JENSEN, C. a Y. TENG. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020, 7: 33, 1-15 [cit. 2023-05-03].
- [44] LUCA, A. C., S. MERSCH, R. DEENEN, S. SHMIDT, I. MESSNER, K.-L. SCHÄFER, S. E. BALDUS, W. HUCKENBECK, R. P. PIEKORZ, W. T. KNOEFEL, A. KRIEG a N. H. STOECKLEIN. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. *PLOS ONE*. 2013, 8(3), 1-11 [cit. 2023-05-29].
- [45] SUAREZ-MARTINEZ, E., I. SUAZO-SANCHEZ, M. CELIS-ROMERO a A. CARNERO. 3D and organoid culture in research: physiology, hereditary genetic diseases and cancer. *Cell and Bioscience*. 2022, 12(1): 39, 1-19 [cit. 2023-05-03].
- [46] KIM, J., B.-K. KOO a J. A. KNOBLICH. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020, 21(10), 571-584 [cit. 2023-05-30].
- [47] LE MAGNEN, C., A. DUTTA a C. ABATE-SHEN. Optimizing mouse models for precision cancer prevention. *Nature Reviews Cancer*. 2016, 16(3), 187-196 [cit. 2023-05-30].
- [48] JIANG, Y. a Y. YU. Transgenic and gene knockout mice in gastric cancer research. *Oncotarget*. 2017, 8(2), 3696-3710 [cit. 2023-05-25].

- [49] DOYLE, A., M. P. MCGARRY, N. A. LEE a J. J. LEE. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Research*. 2012, 21(2), 327-349 [cit. 2023-05-30].
- [50] KEMP, CH. J. Animal Models of Chemical Carcinogenesis: Driving Breakthroughs in Cancer Research for 100 Years. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2015, 2015(10), 865-874 [cit. 2023-06-25].
- [51] GUNTI, S., A. T.K. HOKE, K. P. VU a N. R. LONDON. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers*. 2021, 13(4): 874, 1-17 [cit. 2023-05-06].
- [52] EDMONDSON, R., J. J. BROGLIE, A. F. ADCOCK a L. YANG. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2014, 12(4), 207-218 [cit. 2023-05-07].
- [53] AKKERMAN, N. a L. H. K. DEFIZE. Dawn of the organoid era: 3D tissue and organ cultures revolutionize the study of development, disease, and regeneration. *BioEssays*. 2017, 39(4), 1-10 [cit. 2023-05-31].
- [54] BARTFELD, S. a H. CLEVERS. Organoids as Model for Infectious Diseases: Culture of Human and Murine Stomach Organoids and Microinjection of Helicobacter Pylori. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, (105), 1-9 [cit. 2023-05-15].
- [55] LV, D., Z. HU, L. LU, H. LU a X. XU. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review). *Oncology Letters*. 2017, 14(6), 6999-7010 [cit. 2023-06-01].
- [56] KNIGHT, E. a S. PRZYBORSKI. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*. 2015, 227(6), 746-756 [cit. 2023-05-07].
- [57] BADR-ELDIN, S. M., H. M. ALDAWSARI, S. KOTTA, P. K. DEB a K. N. VENUGOPALA. Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects. *Pharmaceuticals*. 2022, 15(8), 1-28 [cit. 2023-06-01].
- [58] HEO, J. H., D. KANG, S. J. SEO a Y. JIN. Engineering the Extracellular Matrix for Organoid Culture. *International Journal of Stem Cells*. 2022, 15(1), 60-69 [cit. 2023-05-08].

- [59] BONNANS, C., J. CHOU a Z. WERB. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014, 15(12), 786-801 [cit. 2023-05-08].
- [60] SALDIN, L. T., M. C. CRAMER, S. S. VELANKAR, L. J. WHITE a S. F. BADYLAK. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomaterialia*. 2017, 49, 1-15 [cit. 2023-05-09].
- [61] ZHANG, CH.-Y., CH.-P. FU, X.-Y. LI, X.-CH. LU, L.-G. HU, R. K. KANKALA, S.-B. WANG a A.-Z. CHEN. Three-Dimensional Bioprinting of Decellularized Extracellular Matrix-Based Bioinks for Tissue Engineering. *Molecules*. 2022, 27(11): 3442, 1-25 [cit: 2023-05-09].
- [62] PAOLILLO, M. a S. SCHINELLI. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(19): 4947, 1-18 [cit. 2023-05-09].
- [63] HOSHIBA, T. Decellularized Extracellular Matrix for Cancer Research. *Materials*. 2019, 12(8): 1311, 1-16 [cit. 2023-05-10].
- [64] JEE, J. H., D. H. LEE, J. KO, S. HAHN, S. Y. JEONG, H. K. KIM, E. PARK, S. Y. CHOI, S. JEONG, J. W. LEE, H.-J. CHO, M.-S. KWON a J. YOO. Development of Collagen-Based 3D Matrix for Gastrointestinal Tract-Derived Organoid Culture. *Stem Cells International*. 2019, 2019: 8472712, 1-15 [cit. 2023-05-10].
- [65] HOSHIBA, T., G. CHEN, CH. ENDO, H. MARUYAMA, M. WAKUI, E. NEMOTO, N. KAWAZOE a M. TANAKA. Decellularized Extracellular Matrix as an In Vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation. *Stem Cells International*. 2016, 2016: 6397820, 1-10 [cit. 2023-05-10].
- [66] RICHTER, M., O. PIWOCKA, M. MUSIALEK, I. PIOTROWSKI, W. M. SUCHORSKA a T. TRZECIAK. From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021, 9, 1-11 [cit. 2023-05-21].
- [67] MITRA, A., L. MISHRA a S. LI. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends in Biotechnology*. 2013, 31(6), 347-354 [cit. 2023-05-21].
- [68] HUO, CH., X. ZHANG, Y. GU, D. WANG, S. ZHANG, T. LIU, Y. LI a W. HE. Organoids: Construction and Application in Gastric Cancer. *Biomolecules*. 2023, 13(5), 1-14 [cit. 2023-06-17].

- [69] VIS, M. A. M., K. ITO a S. HOFMANN. Impact of Culture Medium on Cellular Interactions in in vitro Co-culture Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, 8, 1-8 [cit. 2023-05-16].
- [70] LI, H., H. LIU a K. CHEN. Living biobank-based cancer organoids: prospects and challenges in cancer research. *Cancer Biology and Medicine*. 2022, 19(7), 965-982 [cit. 2023-05-20].
- [71] PANG, M.-J., J. R. BURCLAFF, R. JIN, M. ADKINS-THREATS, L. H. OSAKI, Y. HAN, J. C. MILLS, Z.-F. MIAO a Z.-N. WANG. Gastric Organoids: Progress and Remaining Challenges. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2022, 13(1), 19-33 [cit. 2023-05-20].
- [72] BARTFELD, S., T. BAYRAM, M. VAN DE WETERING, M. HUCH, H. BEGTHEL, P. KUJALA, R. VRIES, P. J. PETERS a H. CLEVERS. In Vitro Expansion of Human Gastric Epithelial Stem Cells and Their Responses to Bacterial Infection. *Gastroenterology*. 2015, 148(1), 126-136 [cit. 2023-06-02].
- [73] SCHLAERMANN, P., B. TOELLE, H. BERGER, S. C. SCHMIDT, M. GLANEMANN, J. ORDEMANN, S. BARTFELD, H. J. MOLLENKOPF a T. F. MEYER. A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gut*. 2016, 65(2), 202-213 [cit. 2023-06-23].
- [74] GAO, Y., J. DONG, S. QI, X. ZHOU, X. WU, W. WANG, L. WEN, W. FU a F. TANG. Establishment and characterization of adult human gastric epithelial progenitor-like cell lines. *Cell Proliferation*. 2023, 56(6), 1-13 [cit. 2023-06-24].
- [75] JONES, B. C., G. CALÀ, P. DE COPPI a G. G. GIOBBE. Paediatric gastric organoids as a tool for disease modelling and clinical translation. *Pediatric Surgery International*. 2021, 37(3), 317-324 [cit. 2023-06-02].
- [76] NEAL, J. T., X. LI, J. ZHU, V. GIANGARRA, C. L. GRZESKOWIAK, J. JU, I. H. LIU, S.-H. CHIOU, A. A. SALAHUDEEN, A. R. SMITH, B. C. DEUTSCH, L. LIAO, A. J. ZEMEK, F. ZHAO, K. KARLSSON, L. M. SCHULTZ, T. J. METZNER, L. D. NADAULD, Y.-Y. TSENG, S. ALKHAIRY, C. OH, P. KESKULA, D. MENDOZA-VILLANUEVA, F. M. DE LA VEGA, P. L. KUNZ, J. C. LIAO, J. T. LEPPERT, J. B. SUNWOO, CH. SABATTI, J. S. BOEHM, W. C. HAHN, G. X. Y. ZHENG, M. M. DAVIS a C. J. KUO. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*. 2018, 175(7), 1972-1988 [cit. 2023-06-24].

- [77] MIAO, X., C. WANG, CH. CHAI, H. TANG, J. HU, Z. ZHAO, W. LUO, H. ZHANG, K. ZHU, W. ZHOU a H. XU. Establishment of gastric cancer organoid and its application in individualized therapy. *Oncology Letters*. 2022, 24(6), 1-8 [cit. 2023-06-25].
- [78] SONG, H., J. Y. PARK, J.-H. KIM, T.-S. SHIN, S. A. HONG, N. HUDA, B. J. KIM a J. G. KIM. Establishment of Patient-Derived Gastric Cancer Organoid Model From Tissue Obtained by Endoscopic Biopsies. *Journal of Korean Medical Science*. 2022, 37(28), 1-6 [cit. 2023-06-02].
- [79] WUPUTRA, K., CH.-CH. KU, K. KATO, D.-CH. WU, S. SAITO a K. K. YOKOYAMA. Translational models of 3-D organoids and cancer stem cells in gastric cancer research. *Stem Cell Research and Therapy*. 2021, 12(1), 1-16 [cit. 2023-06-25].
- [80] BAGHERI, V., S.-A. ESMAEILI, M. GHOLAMIN a M. R. ABBASZADEGAN. Rapid Isolation of Gastric Adenocarcinoma Cancer Stem Cells as a Target for Autologous Dendritic Cell-Based Immunotherapy. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2022, 20(2), 38-46 [cit. 2023-06-25].
- [81] GAO, M., M. M. HARPER, M. LIN, S. A. QASEM, R. A. PATEL, S. H. MARDINI, M. M. GABR, M. J. CAVNAR, P. K. PANDALAI a J. KIM. Development of a Single-Cell Technique to Increase Yield and Use of Gastrointestinal Cancer Organoids for Personalized Medicine Application. *Journal of the American College of Surgeons*. 2021, 232(4), 504-514 [cit. 2023-06-25].
- [82] SHANG, Z., Y. XU, W. LIANG, K. LIANG, X. HU, L. WANG, Z. ZOU a Y. MA. Isolation of cancer progenitor cells from cancer stem cells in gastric cancer. *Molecular Medicine Reports*. 2017, 15(6), 3637-3643 [cit. 2023-06-25].
- [83] RANI, U., M. SINGH, A. SAITH, S. JAIN, A. AGGARWAL a S. AGGARWAL. Evaluation of use of RPMI medium to preserve cell morphology for pleural/peritoneal fluid cytology. *Journal of Cytology*. 2022, 39(1), 26-29 [cit. 2023-06-25].
- [84] MURAKAMI, S., K.-I. MUKAISHO, T. IWASA, M. KAWABE, S. YOSHIDA, N. TANIURA, T. NAKAYAMA, M. NOI, G. YAMAMOTO, H. SUGIHARA. Application of “Tissueoid Cell Culture System” Using a Silicate Fiber Scaffold for Cancer Research. *Pathobiology*. 2020, 87(5), 291-301 [cit. 2023-06-25].

[85] GILAZIEVA, Z., A. PONOMAREV, C. RUTLAND, A. RIZVANOV a V. SOLOVYEVA. Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine. *Cancers*. 2020, 12(10), 1-19 [cit. 2023-06-25].

[86] TANG, X.-Y., S. WU, D. WANG, CH. CHU, Y. HONG, M. TAO, H. HU, M. XU, X. GUO a Y. LIU. Human organoids in basic research and clinical applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022, 7(1), 1-17 [cit. 2023-06-19].