Artykuł przeglądowy *Review*

Zastosowanie technik hodowli przestrzennych (3D) w badaniach biologii gruczołu mlekowego bydła

MARCIN KOZŁOWSKI, TOMASZ MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Kozłowski M., Motyl T.

Use of three-dimensional cultures (3D) in the investigation of bovine mammary gland biology

Summary

The mammary gland has been extensively studied for over a century. However, the major contribution to our current knowledge of mammary gland biology has been made mostly by studying the mammary gland of humans and rodents, while ruminant models have lagged behind. During the last years, a variety of in vitro approaches have been employed to understand the regulation of mammary gland growth and morphogenesis during different developmental and physiological stages. There are only a few immortalized cell lines of bovine mammary gland epithelium. Unfortunately only three of them are IGF and EGF sensitive, which is very important in mammary gland development in vivo. Monolayer culture models are easy and convenient to set up but they lack the three-dimensional microenvironment of intact tissue. This review describes the three-dimensional (3-D) cell culture system, which has recently been widely used. Bovine primary mammary epithelium cell cultures and some immortalized cell lines plated on an extracellular matrix form functional acini-like structures. This model mimics organization and differentiation of an intact tissue and can be very useful in the investigation of bovine mammary gland biology.

Keywords: three-dimensional cultures, bovine, mammary gland

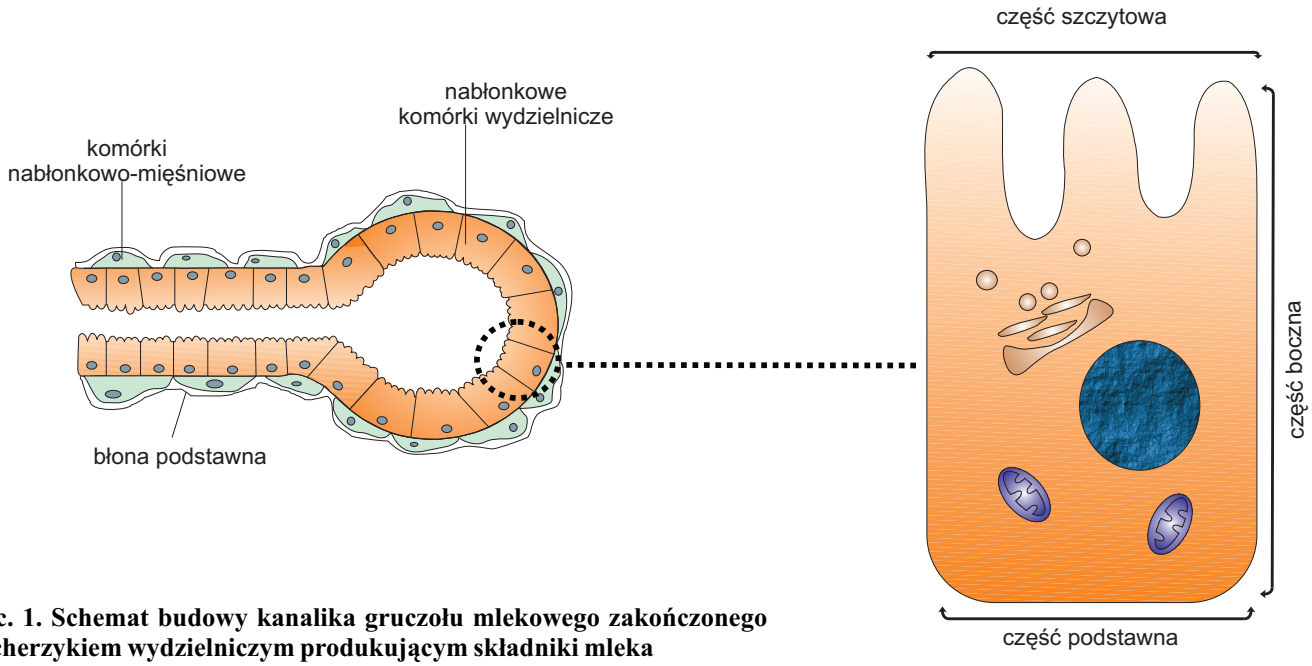
Gruczoł mlekowy, narząd charakterystyczny tylko i wyłącznie dla ssaków, od ponad wieku cieszy się ogromnym zainteresowaniem wśród wielu badaczy. Stanowi doskonały model nie tylko do badań nad procesami produkcji mleka, laktacji i powstawania nowotworów, ale może być użyteczny w znalezieniu odpowiedzi na wiele pytań z zakresu biologii komórki i rozwoju, endokrynologii, jak również biotechnologii.

Wiedza dotycząca biologii gruczołu mlekowego pochodzi głownie z badań prowadzonych na gruczole ludzkim i mysim, niemniej jednak zainteresowanie bydlęcym gruczołem mlekowym nieustannie wzrasta. Związane jest to przede wszystkim z potencjalnym podniesieniem wydajności produkcji mlecznej, a tym samym z ogromnymi korzyściami ekonomicznymi. Ze względu na podobieństwo w budowie histologicznej gruczołu mlekowego model bydlęcy może być doskonałą alternatywą dla mysiego i posłużyć do weryfikacji uzyskanych już wyników. Istotnym powodem jest również to, iż nie odnotowano przypadków występowania nowotworów gruczołu mlekowego u bydła (17, 18). Dokładniejsze badania pod tym kątem mogą więc dostarczyć wielu informacji użytecznych w terapii.

W związku z tym, iż prowadzenie badań *in vivo* ograniczone jest względami etycznymi, jak również ogromnymi nakładami finansowymi, konieczne stało się opracowanie modelu pozwalającego zminimalizować powyższe ograniczenia. Wraz z rozwojem technik hodowli komórek zwierzęcych *in vitro* powstają coraz bardziej zaawansowane systemy, umożliwiające coraz wierniejsze odtworzenie struktur tego narządu w warunkach laboratoryjnych. Niniejsze opracowanie ma na celu przedstawienie modeli wykorzystywanych w badaniu szeroko pojętej biologii gruczołu mlekowego bydła, ze szczególnym uwzględnieniem coraz częściej stosowanych hodowli przestrzennych 3-D.

Budowa gruczołu mlekowego

Gruczoł mlekowy zaczyna się różnicować z ektodermy już we wczesnych stadiach życia embrionalego. Po urodzeniu składa się ze słabo rozwiniętej sieci kanalików znajdujących ujście w zatoce mlecznej połączonej z zatoką strzykową, zakończoną przewodem strzykowym. W czasie 2-3 pierwszych miesięcy życia wzrost jałówek ma charakter allometryczny, niemniej jednak gruczoł mlekowy może ulegać silnemu rozwojowi już w okresie pourodzeniowym. Podczas dojrzewania powstaje zorganizowana, silnie rozgałęziona sieć kanalików i pęcherzyków, otoczonych przez tkankę łączną. Pełnemu rozwojowi gruczoł mlekowy bydła ulega dopiero w czasie ciąży i laktacji. Związany z ciążą cykl, obejmujący wzrost, dojrzewanie i inwolucję gruczołu



Ryc. 1. Schemat budowy kanalika gruczołu mlekowego zakończonego pęcherzykiem wydzielniczym produkującym składniki mleka

mlekowego, powtarza się wielokrotnie w czasie życia bydła mlecznego (19).

Rozgałęzione kanaliki zakończone pęcherzykami, w których zachodzi synteza składników mleka mają budowę dwuwarstwową (ryc. 1). Ich światło wysłane jest nabłonkowymi komórkami wydzielniczymi, otoczonymi warstwą komórek mięśniowo-nabłonkowych. Całość otoczona jest błoną podstawną, stanowiącą rodzaj rusztowania dla opisanych struktur.

Modele bydlęcego nabłonka gruczołu mlekowego *in vitro*

Już w latach osiemdziesiątych XX w. opracowano techniki izolacji i hodowli komórek nabłonkowych bezpośrednio z gruczołu mlekowego (13). Ich morfologia, podobnie jak stan fizjologiczny i wrażliwość metaboliczna są bardzo zbliżone do tych w warunkach *in vivo*. Żmudny proces izolacji, skomplikowane i ograniczone czasowo warunki hodowli, jak również różnice w stanach fizjologicznych zwierząt będących „dawcami", to główne ograniczenia metody kultur pierwotnych. Skłoniły one badaczy do poszukiwania prostszej i dostępniejszej alternatywy, pozwalającej na porównawczą analizę wyników uzyskiwanych przez różne laboratoria.

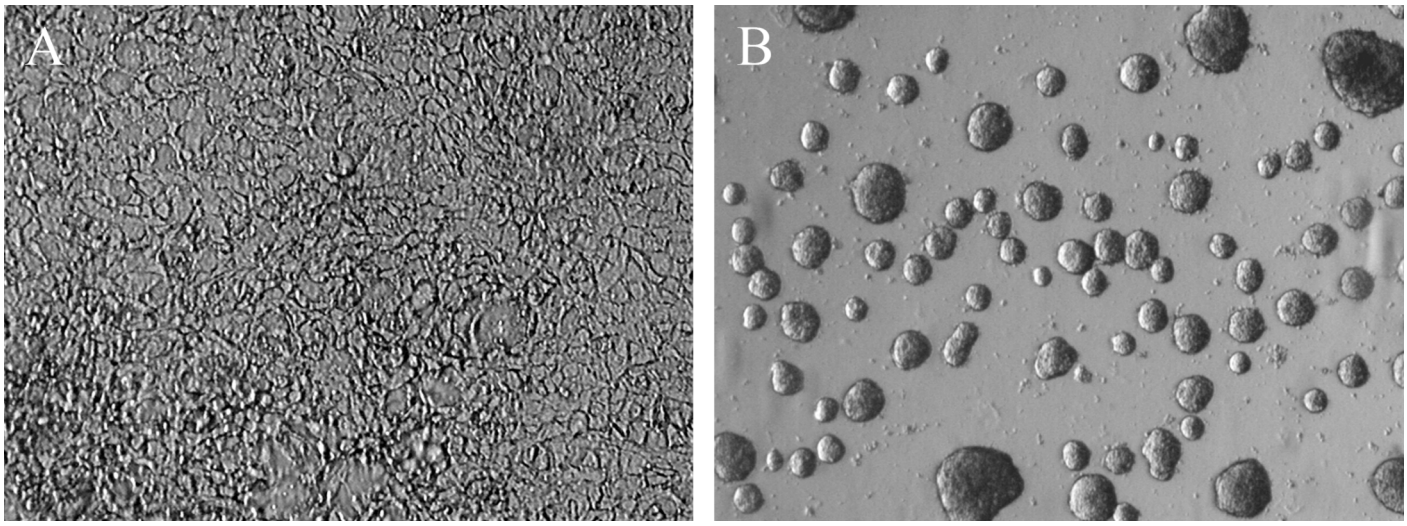
Jednym z bardziej użytecznych narzędzi w badaniach nad biologią bydlęcych komórek gruczołowych okazały się dobrze opisane, unieśmiertelnione linie komórkowe. W 1991 r. Huynh i wsp. (8) transfekowali komórki hodowli pierwotnej nabłonka gruczołowego antygenem T wirusa SV-40. Uzyskana linia, nazwana MAC-T, była pierwszą ustaloną linią komórkową nabłonka bydlęcego gruczołu mlekowego, zdolną do różnicowania i wytwarzania białek mleka w warunkach *in vitro*. Przez kolejne lata była wykorzystywana w badaniach wpływu różnych czynników wzrostowych na proliferację i różnicowanie nabłonka, jak również do wyjaśnienia mechanizmów bakteryjnej patogenezy. Wykazano jednak, iż linia ta nie jest wrażliwa na działanie nabłonkowego czynnika wzrostowego (EGF), bardzo istotnego w rozwoju komórek gruczołu mlekowego *in vivo*.

HH2a jest spontanicznie unieśmiertelnioną linią bydlęcego nabłonka gruczołu mlekowego, niestety, nie jest wrażliwa na działanie czynników wzrostowych i zdolna do produkcji składników mleka (7). Zavizion i wsp. (20, 21), wykorzystując metodę mikroinjekcji, otrzymali trzy kolejne linie: BME-UV (E-T2) i BME-UV1 (E-T) scharakteryzowane jako komórki nabłonka wydzielniczego oraz BME-UV (m-T2) będące pierwszym, opisanym modelem bydlęcych komórek mięśniowo-nabłonkowych. Unikatową właściwością tych linii jest wrażliwość na działanie IGF-I i EGF, stanowią one zatem doskonałe narzędzie do określenia roli tych czynników w rozwoju gruczołu mlekowego, jak również interakcji zachodzących pomiędzy nabłonkowymi komórkami wydzielniczymi i otaczającymi je komórkami mięśniowo-nabłonkowymi.

Hodowle przestrzenne 3D

Na wzrost i rozwój każdej tkanki składa się seria skomplikowanych interakcji międzykomórkowych zachodzących w środowisku stworzonym przez czynniki wzrostowe, hormony, czynniki adhezyjne i złożoną macierz zewnątrzkomórkową. Warunki te nie są możliwe do odtworzenia techniką hodowli jednowarstwowej. Skutecznym narzędziem w badaniach molekularnych procesów tworzenia struktur nabłonkowych są kultury przestrzenne (3-D).

Zdolność komórek nabłonkowych do odtwarzania organizacji tkankowej podczas hodowli trójwymiarowych na macierzach zewnątrzkomórkowych (ECM – extracellular matrix) od dawna jest doceniana przez badaczy. Dają one możliwość wnikliwej analizy mikroskopowej i biochemicznej podstawowych cech strukturalnych nabłonka gruczołowego w warunkach zbli-



Ryc. 2. Komórki linii BME-UV1 hodowane na podłożu plastikowym (A) i Matrigelu® (B)

żonych do tych panujących *in vivo*. Odtworzenie właściwej organizacji tkankowej wymaga możliwości oddziaływania poszczególnych komórek z innymi, jak również z macierzą zewnątrzkomórkową. Hodowle dwuwymiarowe nie oddają prawidłowej struktury wytworzonej w warunkach naturalnych, pozbawiając tym samym komórki niektórych specyficznych właściwości. Ponadto wykazują one różnice morfologiczne w porównaniu do ich budowy *in vivo*, zmianie może ulegać również poziom ekspresji tkankowo specyficznych genów (5). Wykazano, że komórki nabłonkowe w hodowli pierwotnej utrzymywane w jednowarstwie mogą nabywać cechy charakterystyczne dla nowotworów (16).

Wiele czasu poświęcono na opracowanie modelu pozwalającego na odtworzenie procesu morfogenezy pęcherzyka wydzielniczego, poczynając od pojedynczej komórki lub grupy niezorganizowanych komórek, a następnie ich rozwoju w struktury ściśle przypominające pęcherzyk wydzielniczy w warunkach naturalnych. Badania mysiego nowotworu, obficie produkującego macierz zewnątrzkomórkową (ECM), zaowocowały powstaniem substancji komercyjnie nazywanej Matrigelem (11, 15). Jest to sterylny roztwór białek błon podstawnych, wyekstrahowanych z komórek mysiego chrzęstniakomięsaka EHS (Engelbreth-Holm-Swarm). Jego zastosowanie daje o wiele lepsze wyniki w hodowli komórek nabłonkowych niż stosowane wcześniej podłoża kolagenowe (13). W temperaturze 37 stopni tworzy trójwymiarowy żel, wspierający rozwój morfotyczny, różnicowanie i wzrost komórek. Głównymi składnikami są: lamininy, kolagen typu IV i perlecan (10). Laminina I oddziaływuje z receptorem integrynowym, zlokalizowanym w błonie komórkowej, dając tym samym komórce sygnały niezbędne do przeżycia. Brak aktywacji integrynowej ścieżki sygnałowej w normalnych, nietransformowanych komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego prowadzi do apoptozy (1). Ten specyficzny rodzaj śmierci na skutek braku kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową nazywany jest anoikis (6).

Mammosfery

Komórki nabłonka gruczołu mlekowego po wysianu na podłoże pokryte Matrigelem, w obecności hormonów laktogennych dzielą się, tworząc małe agregaty, często w literaturze nazywane mammosferami. Proces ten nie zachodzi w warunkach hodowli na podłożu plastikowym bądź szklanym (ryc. 2).

Kolejnym etapem jest szczytowo-podstawna polaryzajca powstałych struktur. Każda z komórek tworzących w pełni rozwinięty pęcherzyk wydzielniczy ma trzy typy powierzchni błony komórkowej: szczytową – wyścielającą światło pęcherzyka; boczną – przylegającą do sąsiednich komórek; podstawną – kontaktującą się z macierzą zewnątrzkomórkową (ryc. 1). Ponieważ część białek lokalizuje się zarówno w części podstawnej, jak i bocznej, w literaturze często spotykane jest pojęcie części podstawo-bocznej. Polaryzacja polega na uwalnianiu składników macierzy przez część podstawną, lokalizacji aparatu Golgiego w części wierzchołkowej i wytworzeniu połączeń międzykomórkowych w części bocznej. Następnie komórki przestają być wrażliwe na dochodzące z zewnątrz sygnały proliferacji. W wyniku śmierci komórek znajdujących się w centralnej części dochodzi do wytworzenia światła pęcherzyka. Proces ten może zachodzić zarówno na drodze apoptozy, jak i autofagii (2, 14). Komórki wyścielające wnętrze wytworzonego pęcherzyka odpowiednio stymulowane mogą produkować i uwalniać białka mleka.

Oddziaływanie ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej ma kluczowe znaczenie w procesie różnicowania (12). Opisany powyżej proces różnicowania pojedynczych komórek w funkcjonalne pęcherzyki wydzielnicze w warunkach *in vitro* nie jest ograniczony tylko i wyłącznie do komórek hodowli pierwotnej. Podobne efekty można zaobserwować wykorzystując linie ustalone. Spontanicznie unieśmiertelnione komórki ludzkiej linii MCF-10A, wysiane pojedynczo na podłoże pokryte Matrigelem dzielą się, tworząc agregaty. Pomiędzy 5. a 8. dniem hodowli w powstających strukturach można zaobserwować dwa rodzaje komórek:

dobrze spolaryzowane znajdujące się w zewnętrznej warstwie, mającej kontakt z macierzą zewnątrzkomórkową, oraz słabo spolaryzowane komórki warstwy wewnętrznej, nie mającej kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową. Te drugie w niedługim czasie ulegają apoptozie, w wyniku czego tworzy się światło pęcherzyka (3). Uzyskane wyniki znalazły potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych w naszym laboratorium przy wykorzystaniu linii BME-UV1 (ryc. 3).

Przyszłość technik hodowli przestrzennych *in vitro*

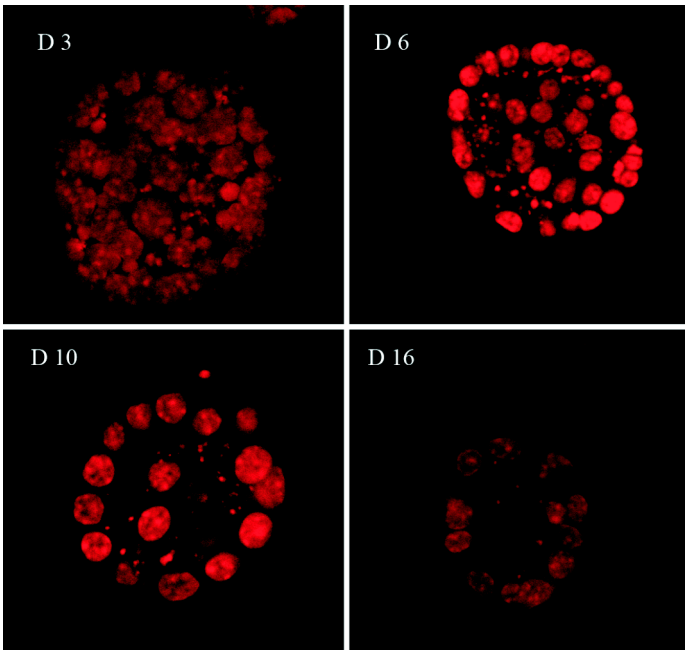
Utrzymanie komórek w warunkach pozwalających na odtworzenie struktury trójwymiarowej nie ogranicza się tylko i wyłącznie do hodowli na macierzy zewnątrzkomórkowej typu Matrigel. Wykazano, iż hodowle na powierzchniach ograniczających adhezje komórek również prowadzą do wytworzenia struktur sferycznych. Spontanicznie łączące się komórki, tworzące agregaty są wykorzystywane m.in. do badań nad komórkami macierzystymi/progenitorowymi gruczołu mlekowego (4). Powstaje coraz więcej, coraz bardziej zaawansowanych systemów hodowli 3-D, poczynając od mieszadeł ułatwiających dostarczanie substancji odżywczych, „mikrokuleczek" zwiększających powierzchnię hodowli, aż po bardzo skomplikowane, biodegradowalne, gotowe struktury, będące podstawą w rozwoju technik kultur tkankowych. Metody te zostały dokładniej opisane przez Jong Bin Kima (9).

Podsumowanie

Wiedza na temat biologii gruczołu mlekowego oparta jest na badaniach przeprowadzonych głównie na tkankach ludzkich i mysich. Pomimo ogromnej wartości użytkowej, badania bydlęcego gruczołu mlekowego pozostają daleko w tyle. Spowodowane jest to m.in. bardzo ograniczoną liczbą dostępnych modeli. Badania *in vivo* limitowane są zarówno względami etycznymi, jak i finansowymi. Również modele *in vitro* zredukowane są do izolacji hodowli pierwotnych lub wykorzystania jedynej, wrażliwej na związki kluczowe dla rozwoju gruczołu mlekowego linii BME-UV. Opracowanie technik hodowli przestrzennych pozwoliło na zredukowanie niedogodności związanych w hodowlą komórek w jednowarstwie. Model ten umożliwia odtworzenie struktur gruczołu mlekowego funkcjonalnie odpowiadających tym występującym w warunkach naturalnych. Możliwość badania interakcji międzykomórkowych, jak również oddziaływań z macierzą zewnątrzkomórkową pozwala na przeniesienie badań z poziomu komórkowego na poziom tkankowy.

Piśmiennictwo

1. *Boudreau N., Sympson C. J., Werb Z., Bissell M. J.*: Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. Science 1995, 267, 891-893.
2. *Debnath J., Mills K. R., Collins N. L., Reginato M. J., Muthuswamy S. K., Brugge J. S.*: The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. Cell 2002, 111, 29-40.
3. *Debnath J., Muthuswamy S. K., Brugge J. S.*: Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. Methods 2003, 30, 256-268.
4. *Dontu G., Abdallah W. M., Foley J. M., Jackson K. W., Clarke M. F., Kawamura M. J., Wicha M. S.*: In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Dev. 2003, 17, 1253-1270.



Ryc. 3. Przekrój poprzeczny „mammosfery" tworzonej przez komórki linii BME-UV1 hodowane na Matrigelu® w 3., 6., 10. i 16. dniu hodowli. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego, jądra komórkowe wyznakowano 7-amino-aktynomycyną-D. We wnętrzu powstającego pęcherzyka widoczne są fragmenty jąder komórek podlegających apoptozie

5. *Emerman J. T., Pitelka D. R.*: Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes. In Vitro 1977, 13, 316-328.
6. *Gilmore A. P., Metcalfe A. D., Romer L. H., Streuli C. H.*: Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. J. Cell Biol. 2000, 149, 431-446.
7. *Huynh H., Pollak M.*: HH2A, an immortalized bovine mammary epithelial cell line, expresses the gene encoding mammary derived growth inhibitor (MDGI). In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 1995, 31, 25-29.
8. *Huynh H. T., Robitaille G., Turner J. D.*: Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. Exp. Cell Res. 1991, 197, 191-199.
9. *Kim J. B.*: Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. Semin. Cancer Biol. 2005, 15, 365-377.
10. *Kleinman H. K., Martin G. R.*: Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. Semin. Cancer Biol. 2005, 15, 378-386.
11. *Kleinman H. K., McGarvey M. L., Hassell J. R., Star V. L., Cannon F. B., Laurie G. W., Martin G. R.*: Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry 1986, 25, 312-318.
12. *Lin C. Q., Bissell M. J.*: Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB J. 1993, 7, 737-743.
13. *Mackenzie D. D., Forsyth I. A., Brooker B. E., Turvey A.*: Culture of bovine mammary epithelial cells on collagen gels. Tissue Cell. 1982, 14, 231-241.
14. *Mills K. R., Reginato M., Debnath J., Queenan B., Brugge J. S.*: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101, 3438-3443.
15. *Orkin R. W., Gehron P., McGoodwin E. B., Martin G. R., Valentine T., Swarm R.*: A murine tumor producing a matrix of basement membrane. J. Exp. Med. 1977, 145, 204-220.
16. *Petersen O. W., Ronnov-Jessen L., Howlett A. R., Bissell M. J.*: Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89, 9064-9068.
17. *Povey R. C., Osborne A. D.*: Mammary gland neoplasia in the cow: a review of literature and report of a fibrosarcoma. Pathol. Vet. 1969, 6, 502-512.
18. *Swett W. W., Matthews C. A., Graves R. R.*: Extreme rarity of cancer in the cow's udder: a negative finding of vital interest to the dairy industry and to the consumer. J. Dairy Sci. 1940, 23, 437-446.
19. *Zarzyńska J., Motyl T.*: Molekularny mechanizm inwolucji gruczołu mlekowego krowy. Medycyna Wet. 2005, 16, 1110-1113.
20. *Zavizion B., van Duffelen M., Schaeffer W., Politis I.*: Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 1996, 32, 138-148.
21. *Zavizion B., van Duffelen M., Schaeffer W., Politis I.*: Establishment and characterization of a bovine mammary myoepithelial cell line. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 1996, 32, 149-158.

Adres autora: mgr Marcin Kozłowski, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: m.kooozlowski@gmail.com