

Ispitivanje toksičnosti na staničnim kulturama

Mustać, Stipe; Kifer, Domagoja; Domijan, Ana-Marija; Marjanović Čermak, Ana Marija

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2022, 78, 1 - 14**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:680912>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ispitivanje toksičnosti na staničnim kulturama

STIPE MUSTAČ¹, DOMAGOJ KIFER², ANA-MARIJA DOMIJAN³,
ANA MARIJA MARJANOVIĆ ČERMAK⁴

¹Student 5. godine studija farmacije, Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb,
Hrvatska

²Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za biofiziku, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska

³Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku botaniku, Schrottova 39,
10 000 Zagreb, Hrvatska

⁴Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada,
Jedinica za dozimetriju zračenja i radiobiologiju, Ksaverska cesta 2,
10 000 Zagreb, Hrvatska

Uvod

Kemijska, farmaceutska i kozmetička industrija te regulatorna tijela danas rutinski koriste *in vitro* metode za ispitivanje toksičnosti. Na osnovu dobivenih rezultata može se procijeniti sigurnost i odrediti rizik upotrebe nekog spoja. Rezultati *in vitro* ispitivanja daju uvida u događaje na staničnoj i molekularnoj razini te omogućuju bolje predviđanje ishoda *in vivo* istraživanja. Naime, događaji na staničnoj i molekularnoj razini koji su prikazani prilikom ispitivanja *in vitro* mogu korelirati s *in vivo* fiziološkim procesima te tako pomoći u razumijevanju nastanka određenih stanja u živom organizmu (1). Stanične kulture unaprijedile su znanstvena istraživanja te ih se osim za ispitivanje toksičnosti spojeva upotrebljava i u proizvodnji cjepiva, ispitivanju metabolizma lijekova i funkciji gena, stvaranju umjetnih tkiva te sintezi bioloških spojeva, npr. terapeutskih proteina (2). Pored toga, tijekom razvoja lijeka, a nakon što se ustanovi da ispitivani spoj postiže željeni biološki učinak *in vitro*, optimizacija tog spoja i njegovih farmakoloških karakteristika provodi se na *in vitro* modelima prije nego se nastavi s daljnjim fazama razvoja (3).

Regulatorna tijela poput Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA), Agencije za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske (HALMED) ili Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (HAPIH) moraju osigurati zaštitu radnika prilikom proizvodnje kemikalija, provjeriti sigurnost hrane i pića, zaštititi pacijente od mogućih opasnosti od lijekova i medicinskih uređaja te zaštititi ljude i okoliš od potencijalne opasnosti, primjerice od pesticida. Ispitivanja toksičnosti takvih spojeva većinom se provode na eksperimentalnim životinjama. Protetkih je desetljeća učinjen znatan napor kako bi se smanjio broj testiranja na eksperimentalnim životinjama, a što je bio jedan od glavnih poticaja za razvoj staničnih kultura i testova ispitivanja toksičnosti *in vitro*. Sve do 80-tih godina prošlog stoljeća jedini je koncept za smanjenje broja ispitivanja na eksperimentalnim životinjama bio princip tri „R“ (engl. *reduction, refinement, replacement* – smanjenje, poboljšanje, zamjena), predložen 1959. godine (4). Prekretnica u smanjenju broja ispitivanja na eksperimentalnim životinjama dogodila se 1982. godine, kada je međunarodna Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD) uskladila ispitivanja toksičnosti unutar zemalja članica, na način da sve zemlje članice, bez obzira gdje je provedeno istraživanje, prihvate rezultate *in vivo* ispitivanja toksičnosti ako su ista provedena prema smjernicama OECD-a. Na isti način postupilo je i Međunarodno vijeće za usklađivanje tehničkih zahtjeva za farmaceutske proizvode za ljudsku upotrebu (engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) koje okuplja i usklađuje zahtjeve regulatornih tijela i farmaceutske industriju triju velikih svjetskih ekonomskih regija Europe, Japana i Sjedinjenih Američkih Država (SAD). Idući je korak u cilju smanjenja korištenja eksperimentalnih životinja bio osmišljavanje i razvoj alternativnih načina testiranja koji bi omogućili jednak način klasifikacije i obilježavanja spojeva kao što je to slučaj s ispitivanjima na eksperimentalnim životinjama. Ispitivanja na staničnim kulturama mogla su biti prihvaćena u regulatorne svrhe tek nakon uspješne validacije metoda, što je ujedno i dokaz da *in vitro* ispitivanja toksičnosti pružaju jednaku razinu pouzdanosti i sigurnosti kao ispitivanja na eksperimentalnim životinjama. Znanstvenici su nakon niza pokušaja u tome i uspjeli. Europski centar za validaciju alternativnih metoda (engl. *European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM) je 1995. i 1996. godine prihvatio koncept validacije metoda koje bi trebale zamijeniti *in vivo* testiranja s onima *in vitro*. Prva *in vitro* metoda za ispitivanje toksičnosti validirana je 1998. godine. To je bila 3T3 NRU metoda ispitivanja fototoksičnosti koja je koristila staničnu liniju mišjih embrionalnih fibroblasta (3T3 staničnu liniju) pri kojoj se

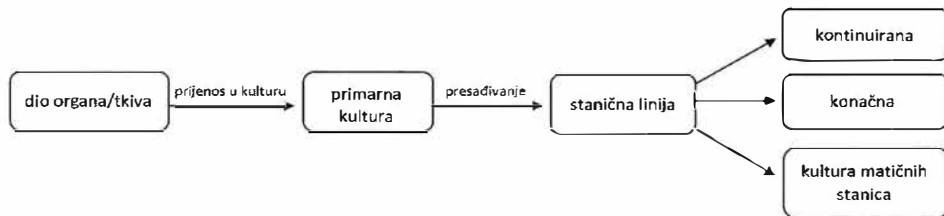
ulazak neutralno crvene boje (engl. *Neutral Red Uptake*, NRU) koristi kao pokazatelj vijabilnosti stanica. Godine 2000. metoda je službeno prihvaćena za korištenje u regulatorne svrhe. OECD je metodu prihvatio 2004. godine, što je 3T3 NRU metodu učinilo i međunarodno prihvaćenom te otvorilo put daljnjem prihvaćanju *in vitro* metoda za ispitivanje i klasifikaciju toksičnih spojeva (5, 6).

Iako se ulaže veliki napor kako bi se smanjio broj ispitivanja na eksperimentalnim životinjama te se *in vivo* nastoji zamijeniti jednako pouzdanim *in vitro* ispitivanjima, u većini slučajeva to nije moguće. Razlog je taj što *in vitro* ispitivanja ne daju odgovore na pitanja tkivno-specifične toksičnosti, pojavu adaptivnog odgovora te metaboličke promjene koje se zbivaju u živom organizmu. Također, ispitivanjem na staničnim kulturama nije moguće procijeniti sistemsku toksičnost te je teško odrediti toksične doze i jasno povezati podatke dobivene *in vitro* s onima *in vivo*. Ipak, postoje izračuni pomoću kojih se može na osnovu rezultata dobivenih *in vitro* na staničnim kulturama odrediti početna doza za ispitivanje toksičnosti *in vivo*. Na temelju IC₅₀ (engl. *Inhibitory Concentration*; koncentracija spoja inhibitora pri kojoj se postiže 50 % maksimalne inhibitorne aktivnosti) dobivenog *in vitro* ispitivanjem toksičnosti moguće je procijeniti početnu dozu za određivanje akutne oralne toksičnosti, odnosno za određivanje LD₅₀ (engl. *Lethal Dose*; doza toksičnog spoja pri kojoj ugiba 50 % testiranih životinja) koristeći linearnu regresiju. Na taj način moguće je smanjiti broj laboratorijskih životinja korištenih u tim pokusima za čak 30 % (7). U odnosu na *in vivo* ispitivanja kod kojih ima više varijabli koje mogu utjecati na dobivene rezultate, stanične kulture su jednostavnije te je stoga lakše postaviti istraživanje i reproducirati ga. U pravilu je za *in vitro* istraživanja potrebna manja količina spoja koji se ispituje te je time sama cijena ispitivanja niža, a dolazi i do uštede vremena (8). Stanične kulture jednostavnije su za održavanje (kultiviranje) i umnažanje, a samo istraživanje etički je prihvatljivije u odnosu na *in vivo* istraživanje (uz neke iznimke čija je etičnost i dalje upitna, kao što su npr. ljudske embrionalne matične stanice ili donacija ljudskog tkiva) (1). Unatoč tome, daljnja optimizacija i razvoj *in vitro* istraživanja nužna je kako bi rezultati dobiveni *in vitro* mogli što bolje predvidjeti *in vivo* učinke (9).

Stanične kulture

Stanične kulture su kulture stanica koje se uzgajaju umjetno, izvan njihova prirodnog okruženja u kontroliranim *in vitro* uvjetima. Stanične kulture su dispergirane stanice u suspenziji koje se stavljaju u posudicu za uzgoj kulture s hranjivim medijem. Hranjivi medij sadrži različite aminokiseline, vitamine, soli i glukozu te serum koji predstavlja izvor polipeptidnih faktora rasta nužnih za diobu stanica.

Stanice se čuvaju na temperaturi od 37 °C, pri 5 % ugljikova (IV) oksida i 95 % atmosferskog zraka. Kako bi se spriječila kontaminacija osjetljivih staničnih kultura, moraju se održavati sterilni laboratorijski uvjeti rada. Nakon primarne diobe, stanice se subkultiviraju, odnosno dalje nasaduju u novu posudicu za uzgoj u kojoj se ponovno dijele (10). Razlikuju se primarne, kontinuirane i konačne stanične kulture te kulture matičnih stanica (slika 1.).



Slika 1. ► Prikaz glavnih sastavnica *in vitro* sustava (autorska slika)

Primarne kulture stanica su stanične kulture dobivene izravno iz ljudskog ili životinjskog tkiva. Većinom takve kulture pokazuju karakteristike stanica slične onima *in vivo*. Stoga se često koriste za temeljna istraživanja i imaju brojne primjene u *in vitro* istraživanjima. Iako stanice nekih primarnih kultura mogu proliferirati i biti subkultivirane, one u pravilu imaju ograničen životni vijek, a s vremenom mijenjaju svoje karakteristike dobivene diferencijacijom. Primarne kulture stanica vrlo često trebaju kompleksni medij za uzgoj koji osim životinjskog seruma sadrži i nutrijente koji su teže dostupni ili nisu jasno definirani. Primarne stanične kulture često su heterogene te je zbog mnogobrojnih varijacija koje se ne mogu kontrolirati takve kulture teško standardizirati, a time je ispitivanje teže reproducirati. Uzgajaju se unutar suspenzija, ali i na staklu ili plastici te se tada dijele unutar jednog sloja (11).

Subkultivacijom primarnih kultura dobivaju se kontinuirane i konačne stanične kulture. Stanične kulture koje se mogu neograničen broj puta subkultivirati nazivaju se kontinuiranim staničnim kulturama. Takve stanične kulture ne pokazuju senescenciju, tj. stabilan i stalan prestanak proliferacije stanica unatoč vijabilnosti i održanoj metaboličkoj aktivnosti te se stoga još nazivaju i imortaliziranim (10, 11). Dobivaju se iz zdravog embrionalnog ili tumorskog tkiva ljudi ili životinja. Kontinuirane se stanične kulture mogu pojaviti spontano ili ih se može proizvesti nekim metodama kao što su:

- izlaganje normalnih stanica i tkiva radioaktivnom zračenju ili tretiranje kemijskim mutagenima ili karcinogenima,

- ♦ izolacija iz kultura inficiranih virusima (npr. Epstein-Barr virus),
- ♦ genetska modifikacija stanica transfekcijom kloniranim genima,
- ♦ izolacijom iz transgeničnih životinja.

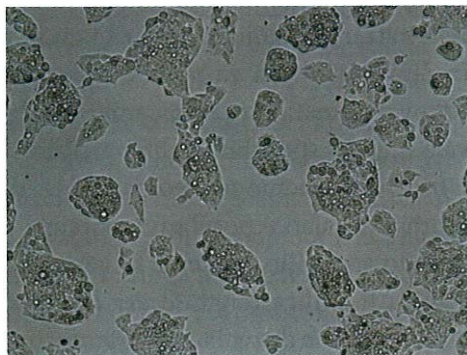
Velik se broj kontinuiranih staničnih kultura smatra stabilnim kroz duži vremenski period, ipak u pojedinim slučajevima može doći do ireverzibilnih promjena te ih nije preporučljivo izlagati promjenjivim uvjetima kultivacije (uzgoja) i presađivanja. Važno je uspostaviti zalihe krioprezerviranih stanica, što znači da ih je potrebno čuvati na vrlo niskim temperaturama kako bi ostale strukturno netaknute. Česta je laboratorijska praksa pohranjivati stanice u spremnicima tekućeg dušika, pri temperaturama od $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (7, 9). Kontinuirane stanične kulture lakše su za rukovanje, većinom rastu unutar jednog sloja te do konfluencije (postotak površine koju zauzimaju stanice u odnosu na ukupnu površinu posude za uzgoj u kojoj se nalaze) dolazi unutar relativno kratkog vremena, stoga njihova uporaba pojednostavljuje uvjete ispitivanja toksičnosti (8).

Konačne stanične kulture imaju sposobnost višestruke subkultivacije, no nakon nekog vremena ulaze u stadij senescencije, gdje prestaje stanična dioba, no stanice ostaju vijabilne te zadržavaju neku razinu funkcionalne aktivnosti. Kako se konačne stanične kulture približavaju stadiju senescencije, prolaze neke metaboličke promjene te ih se ne preporuča koristiti nakon određenog broja diobi koji je za svaku konačnu staničnu kulturu određen eksperimentalno. Dostupne su brojne konačne stanične kulture, od kojih je najveći broj humanih fibroblasta, koje karakterizira genetska stabilnost te ulaze u stadij senescencije nakon 60–70 dioba (11).

Kulture matičnih stanica, kao što su embrionalne ili zametne stanice, vrsta su kontinuiranih staničnih kultura. Izuzme li se njihova sposobnost neograničene diobe, najvažnija je karakteristika matičnih stanica što ih je moguće diferencirati u bilo koji tip stanica koji se može pronaći u ljudskom organizmu i to ih čini pogodnim za gotovo sve vrste istraživanja. Pri održavanju, čuvanju i rukovanju matičnim stanicama potrebno je biti izrazito oprezan kako bi se očuvala njihova sposobnost diferencijacije (11, 12). Matične se stanice u teoriji u *in vitro* uvjetima mogu neograničeno dijeliti u nediferenciranom stanju, ali se moraju uzgajati u posebnim uvjetima jer imaju tendenciju diferencijacije. Kako bi se to spriječilo, najčešće se kao podloga dodaje sloj nemitotskih stanica, tzv. stanica hranilica (engl. *feeder layer*), najčešće mišjih fibroblasta, koje izlučuju faktore koji ne dozvoljavaju diferencijaciju, ili se to može postići dodatkom vanjskih faktora, citokina, seruma i sl. (13). Budući da je za dobivanje humanih embrionalnih matičnih stanica potrebno razaranje ranih ljudskih embrija, etičnost i zakonitost uporabe takvih staničnih kultura čest je predmet rasprava (12).

Bez obzira što se kontinuirane stanične kulture danas vrlo često koriste zbog svog svojstva besmrtnosti, njihova je primjena ograničena, ponajviše zbog toga što se razlikuju od normalnih stanica ljudskog organizma. Stoga u usporedbi s kontinuiranim staničnim kulturama, primarne kulture stanica imaju prednost jer zadržavaju veći broj karakteristika *in vivo* uzorka, kao što je sličan broj kromosoma te neka biokemijska svojstva (1, 14). Primarne i kontinuirane stanične kulture međusobno se ponajviše razlikuju u svojim proteomima. Iako su im proteomi kvalitativno slični, kvantitativna razlika prilično je velika. Kontinuirane stanične kulture imaju puno izraženiju ekspresiju proteina zaduženih za mitotski ciklus te staničnu diobu općenito, dok primarne stanične kulture imaju puno veću razinu ostalih proteina, primjerice onih uključenih u metabolizam ili proteine koji čine izvanstanični matriks. Tako primarne kulture stanica jetre, odnosno primarni hepatociti proizvode znatno više albumina i enzima za razgradnju lijekova. Ovisno o kojem se proteinu radi i njegovoj funkciji, razlika između količine toga proteina prisutnog u primarnoj ili kontinuiranoj staničnoj kulturi može iznositi i nekoliko redova veličine (12, 15).

U ispitivanju toksičnosti spojeva koristi se velik broj ljudskih staničnih kultura, no najčešće se koriste primarni ljudski hepatociti (16). Za izolaciju primarnih ljudskih hepatocita jetreno tkivo odrasle osobe dobiva se ili od donora podvrgnutih operaciji resekcije jetre za uklanjanje metastaziranih tumora ili od donora srca koji još dišu, no nalaze se u stanju cerebralne smrti, budući da je jetreno tkivo osjetljivo na ishemiju i brzo propada nakon smrti (17). Kao alternativa primarnim hepatocitima u istraživanjima se koristi kontinuirana stanična kultura ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2, slika 2.). Njihova prednost je stabilni fenotip, dostupnost i jednostavnost korištenja. Nedostatak HepG2 stanica i drugih kontinuiranih staničnih kultura je da za razliku od primarnih ljudskih hepatocita imaju znatno manji udio enzima citokrom P450. Citokrom P450 enzimi važni su u metabolizmu brojnih endogenih spojeva te također metaboliziraju i širok raspon ksenobiotika uključujući lijekove, zagađivače okoliša, prirodne biljne produkte i alkohole (18, 19). Stanične kulture s manjim udjelom enzima ili bez enzima značajan su eksperimentalni problem u onim pokusima u kojima



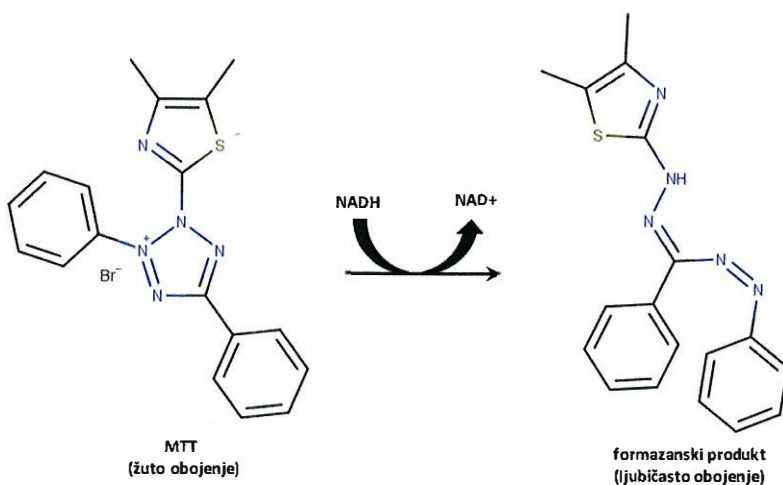
Slika 2. ► Hep G2 stanice u kulturi (invertni mikroskop Olympus CKX41, povećanje 100x; autorska fotografija)

je potrebna bioaktivacija spoja koji se ispituje (16, 20). Ako se prilikom ispitivanja koristi stanična linija s manjim udjelom ili bez citokrom P450 enzima neće doći do pretvorbe takvih spojeva u njihove toksične metabolite te njihova toksičnost neće biti zabilježena.

Testovi ispitivanja citotoksičnosti

Ispitivanje toksičnosti nekoga spoja *in vitro* (citotoksičnost) provodi se tretiranjem stanične kulture s ispitivanim spojem, a potom se, nakon perioda inkubacije, odredi broj preostalih živućih/vijabilnih stanica (uz pretpostavku da je ispitivani spoj doveo do smrti određenog dijela stanica). Period inkubacije obično je 24 sata, a u ispitivanjima je uvijek, zbog usporedbe, uključen i uzorak stanične kulture koji nije tretiran ispitivanim spojem te služi kao kontrola. Usporedba broja živih/vijabilnih stanica nakon tretmana nekim spojem s netretiranom kontrolom govori o citotoksičnosti tog spoja. Testovi procjene broja živućih stanica u kulturi najčešće se temelje na mjerenju indikatora metaboličke aktivnosti (21).

Prvi konvencionalni *in vitro* test za određivanje citotoksičnosti velikog broja spojeva (test brzog pretraživanja, tzv. „*screening test*“) je metoda redukcije tetrazolijeve MTT soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), tzv. MTT test. MTT test je kolorimetrijska metoda koja se bazira na sposobnosti živih stanica da reduciraju topljivu žutu tetrazolijevu sol u netopljivi tamno ljubičasti formazan (slika 3.). Stanična membrana je nepropusna za kristale formazana



Slika 3. ► Metoda redukcije tetrazolijeve MTT soli (struktura MTT-a i formazanskog produkta, autorska slika)

te se oni prethodno moraju otopiti kako bi se izmjerili spektrofotometrijski. Izmjerena apsorbanacija direktno je razmjerna broju živućih/vijabilnih stanica, što omogućuje kvantifikaciju živih stanica. S vremenom su se razvili i poboljšani reagensi (npr. MTS, XTT, WST) koji se mogu izravno prevesti u topivi formazan i na taj način izbjeći proces otapanja koji je ključan za provođenje MTT testa (21).

Sljedeći reagens koji se koristi prilikom ispitivanja toksičnosti *in vitro* je resazurin. Resazurin je tamno plava redoks osjetljiva boja koja se ulaskom u živu stanicu reducira u roza obojani rezorufin koji fluorescira. Količina rezorufina proporcionalna je broju živih stanica i mjeri se pri ekscitaciji od 560 nm, odnosno emisiji od 590 nm. Iako ima veću osjetljivost, nedostatak resazurinskog testa vezan je uz intenzivno plavo obojenje otopine te mogućnost interferencije testiranog spoja s rezorufinskim produktom. Glavni nedostatak tetrazolijevih i resazurinskih redukcijskih testova je taj da su i oni sami toksični za stanice (21).

Test ulaska neutralno crvene boje, NRU jedan je od najčešće korištenih testova citotoksičnosti. Temelji se na sposobnosti živih stanica da vežu boju neutralno crveno. Neutralno crveno je slaba kationska boja koja ima sposobnost prolaska kroz staničnu membranu pasivnom difuzijom nakon čega se ukoncentrira u lizosomima gdje se veže elektrostatskim hidrofobnim vezama za anionske i fosfatne skupine prisutne u lizosomalnom matriksu. Iz živih stanica boja se ekstrahira pomoću zakiseljene otopine etanola te se zatim mjeri spektrofotometrijski. Izmjerena apsorbanacija direktno je razmjerna broju živih stanica. Unos neutralnog crvenog u stanicu ovisi o sposobnosti stanice da održi pH gradijent u procesu proizvodnje ATP-a. Pri fiziološkom pH, naboj boje je blizu neutralnog, što mu omogućuje ulazak u stanicu kroz membranu. Unutar lizosoma pH je niži od onog u citoplazmi. Tako neutralno crveno dobiva negativan naboj i zadržava se unutar lizosoma (20).

Citotoksičnost je moguće mjeriti i određivanjem koncentracije enzima koji su izašli iz stanice. Stanice koje su vijabilne imaju funkcionalnu staničnu membranu te ne dolazi do izlaska enzima, međutim zbog djelovanja ispitivanog spoja može doći do oštećenja stanične membrane nekrozom i izlaska enzima iz stanice. Jedna od metoda mjerenja citotoksičnosti detekcijom nekroze, uključujući i sekundarnu nekrozu temelji se na izlaženju citoplazmatskog enzima, laktat dehidrogenaze (LDH) iz oštećene stanice. Da bi se izmjerio LDH, u testu se koriste tetrazolijeve soli. Nakon što LDH proizvede reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) u reakciji katalizirane oksidacije laktata u piruvat, tetrazolijeva sol pretvara se u formazanski produkt koristeći nosintetizirani NADH u prisutnosti akceptora elektrona. Količina formazana može se kvantificirati

spektrofotometrijski što omogućuje procjenu broja stanica kojima je oštećena stanična membrana (22).

Proteinski test neizravan je način mjerenja citotoksičnosti nekog spoja mjerenjem sadržaja proteina u vijabilnim stanicama. Nakon tretiranja s ispitivanim spojem, posude za uzgoj staničnih kultura se ispiru te se u preostalim stanicama (vijabilnim) određuje koncentracija proteina. Određivanje proteina bazira se na Bradfordovoj metodi koristeći Coomassie reagens, a apsorbancija nastale boje mjeri se spektrofotometrijski te omogućuje kvantifikaciju proteina u vijabilnim stanicama (18).

Proces stanične smrti rezultira gubitkom sposobnosti stanice da sintetizira novi ATP i brzim gubitkom postojećeg citoplazmatskog ATP-a kojeg razgrađuju endogene ATP-aze. Stoga se ATP može koristiti za određivanja živih/vijabilnih stanica. Količina ATP-a mjeri se korištenjem enzima luciferaze krijesnica koji uz luciferin i ATP daje luminescentni signal. Velika osjetljivost testa dobiva se zahvaljujući vrlo niskoj pozadinskoj luminescenciji što omogućava postizanje velikog omjera signala i pozadine. Postupak dodavanja jednog homogenog reagensa rezultira trenutnom lizom stanica i nastajanjem svjetlećeg luminescentnog signala. Za razliku od npr. MTT ili resazurinskog testa, nije potrebna inkubacija stanica s reagensom u trajanju od više sati što smanjuje vjerojatnost pogreške unutar pokusa (21).

Prema istraživanju iz 2006. godine, MTT test i test s neutralnim crvenim pokazali su se osjetljivijima u detekciji rane toksičnosti od testa mjerenja LDH te proteinskog testa, dok se detekcija ATP-a smatra zlatnim standardom testova vijabilnosti stanica (18). U tablici 1. navedeni su najčešće korišteni testovi za određivanje stanične vijabilnosti.

Mjerenje biološke aktivnosti

Najveći broj *in vitro* istraživanja mjeri biološki potencijal ispitivanog spoja kao IC_{50} (engl. *Inhibitory Concentration*, IC) ili EC_{50} (engl. *Effective Concentration*, EC). Iako su EC_{50} i IC_{50} slični pojmovi koji se određuju na gotovo identičan način, razlika između njih postoji. EC_{50} definira koncentraciju potrebnu da spoj postigne 50 % maksimalnog fiziološkog učinka. Često se koristi u farmakološkim istraživanjima za evaluaciju učinka nekog lijeka. S druge strane, IC_{50} predstavlja koncentraciju nekog spoja inhibitora pri kojoj se postiže 50 % maksimalne inhibitorne aktivnosti. Iako se i ovaj pojam koristi u farmakologiji u slučaju procjene učinka spoja inhibitora ili antagonista receptora, češće se upotrebljava u toksikologiji za izražavanje toksičnog učinka nekog spoja. Nadalje, razlikuju se apsolutna i relativna IC_{50} i EC_{50} . Apsolutna EC_{50} definirana je kao molarna koncentracija

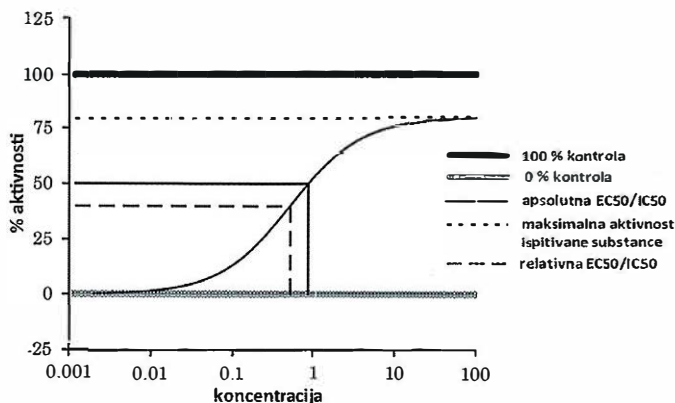
Tablica 1. ► Prikaz najčešće korištenih *in vitro* testova za određivanje stanične citotoksičnosti (23,24)

Metoda	Prednosti	Nedostaci
MTT	široka primjena isplativost	inkubacija 1–4 h formazanski produkt je potrebno otopiti ograničena osjetljivost mogućnost interferencije toksičan za stanice
Resazurin	isplativost povećana osjetljivost fluorescencija	inkubacija 1–4 h mogućnost interferencije toksičan za stanice
Neutralno crveno	povećana osjetljivost može se kombinirati s određivanjem ukupne količine proteina	mogućnost interferencije
ATP	brza detekcija visoka osjetljivost stabilan signal nema interferencija nema perioda inkubacije sa stanicama	mogućnost tehničkih pogrešaka poput pipetiranja
LDH	pouzdan brz jednostavan	interferencija sa staničnim serumom koji ima LDH aktivnost

Legenda: MTT– (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid); ATP-adenozin-trifosfat; LDH-laktat dehidrogenaza

spoja koja uzrokuje 50 % maksimalnog mogućeg antagonističkog učinka u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu, dok je apsolutna IC_{50} definirana kao molarna koncentracija spoja (inhibitora) potrebna da se reakcija na testirani spoj (u većini slučajeva ta je reakcija vijabilnost stanica) smanji na 50 %, tj. na pola između pozitivne i negativne kontrole. Relativna EC_{50} je molarna koncentracija spoja koja daje 50 % učinka u odnosu na maksimalni učinak tog samog spoja, dok je relativna IC_{50} molarna koncentracija ispitivanog spoja (inhibitora) koja ima 50 % učinka maksimalne inhibicije tim spojem. IC_{50} i EC_{50} računaju se iz sigmoidalne krivulje stupnjevitog odnosa doze i učinka (engl. *dose-response curve*) (slika 4.). Da bi se izračunali IC_{50} ili EC_{50} , potrebno je imati čitavu sigmoidalnu krivulju doze i učinka, tj. dovoljan broj mjerenja, odnosno ispitivanih koncentracija da se krivulja adekvatno konstruira (25). Krivulja doze i učinka dobiva se matematičkim modelom (logistički model sa 4 parametra) dizajniranim na način da olakša odrediti koncentraciju (dozu) pri kojoj je postignuto 50 % učinka tako da je ta koncentracija (doza) upravo i jedan od parametara tog modela (26).

Slika 4. ► Krivulja stupnjevitog odnosa doze i učinka (engl. dose-response curve, prilagođeno prema Sebaugh, 2011) (25)



Smjernice o provedbi ispitivanja na staničnim kulturama

Kako bi se povećala pouzdanost i reproducibilnost te kako bi se dobiveni rezultati nekog istraživanja mogli prihvatiti i primijeniti, tijekom istraživanja potrebno je održavati standarde visoke kvalitete. U tu svrhu OECD je definirao niz pravila i kriterija Dobre laboratorijske prakse (engl. *Good Laboratory Practice*, GLP) koji se odnose na sustav kontrole kvalitete koji pokriva organizacijski proces i uvjete unutar kojih je potrebno planirati, izvoditi i nadzirati istraživanje (27). Na GLP nadovezuje se i smjernica Dobrog uzgoja staničnih kultura (engl. *Good Cell Culture Practice*, GCCP) koju je izdao ECVAM. Cilj GCCP je smanjenje nepouzdanosti u razvoju i primjeni ljudskih i životinjskih kultura stanica na način da potiče međunarodnu harmonizaciju, racionalizaciju i standardizaciju laboratorijske prakse, sustav kontrole kvalitete, sigurnosne procedure, bilježenje i izvještavanje o rezultatima pokusa, kao i usklađenost zakona, regulacije i etičkih principa (11). U smjernicama međunarodnih regulatornih institucija OECD, ICH i ECVAM ne nalaze se samo upute za održavanje visokog standarda kvalitete istraživanja, već i smjernice za *in vitro* metode procjene toksičnosti određenog spoja s jasno definiranim uvjetima istraživanja, staničnim kulturama te testovima koji bi se u tom istraživanju trebali upotrijebiti. Tako se na mrežnim stranicama tih institucija mogu naći dostupne smjernice za testiranje iritacije kože i očiju, ispitivanje fototoksičnosti, genotoksičnosti, karcinogenosti te drugih toksičnih učinaka.

Zaključak

Ispitivanja na staničnim kulturama tijekom posljednjih desetljeća postala su neizostavan dio biomedicinskih istraživanja. Upotreba staničnih kultura i *in vitro* modela općenito pojednostavljuju dizajn pokusa te omogućuju

prilagodbu individualnim potrebama i svrsi pojedinog istraživanja. Korištenjem staničnih kultura skraćuje se vrijeme istraživanja i u konačnici smanjuju troškovi. Stoga su stanične kulture postale ključan alat za otkrivanje i razumijevanje raznih fizioloških i patoloških mehanizama koji se odvijaju na staničnoj razini, što omogućuje pronalazak novih bioloških meta na koje mogu djelovati potencijalni lijekovi. Stanične kulture ključne su u farmaceutskoj industriji u predkliničkoj fazi razvoja lijekova i u regulatornim institucijama u cilju smanjenja korištenja životinja. S druge strane, nedostaci vezani uz korištenje staničnih kultura rezultat su nemogućnosti adekvatnog praćenja metabolizma spoja te nemogućnosti vjerne simulacije realnog okruženja na razini stanice, tkiva ili organa.

Novi *in vitro* modeli koji se razvijaju moraju što vjernije prikazati strukturnu i funkcionalnu kompleksnost tkiva i organa, što je ujedno i najveći izazov pri njihovom razvoju. Razvoj *in vitro* modela obuhvaća nove metode uzgoja stanica, umjetne izvanstanične matrikse, načine uzgoja više kultura odjednom, trodimenzionalne kulture stanica i organe na čipu (engl. *organ-on-a-chip*) koje čine stanice u kulturi i elektronički čip te u toj kombinaciji imaju znatno veću sposobnost simulacije aktivnosti organa i tkiva. Osim novih staničnih modela, razvijaju se i novi testovi ispitivanja toksičnosti, a sve se veća važnost pridaje i razvoju raznih modela analize rezultata istraživanja kako bi se izbjeglo donošenje pogrešnih zaključaka o rezultatima pokusa. Važno je za kraj istaknuti i ulogu raznih međunarodnih regulatornih institucija, koja imaju zadatak provesti validaciju i standardizaciju novo-razvijenih metoda. Njihov je cilj istraživanja učiniti što pouzdanijim, točnijim i reproducibilnijim, jer inače uporaba *in vitro* modela u svim aspektima istraživačkih i regulatornih djelatnosti općenito ne bi bila moguća.

Zahvale

Autori zahvaljuju na financijskoj potpori Sveučilištu u Zagrebu i Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada.



Toxicity testing on cell cultures

S. Mustač, D. Kifer, A.-M. Domijan, A. M. Marjanović Čermak

Abstract In recent years significant efforts have been made to reduce the number of studies on experimental animals used for toxicity testing of new compounds. In addition to the already existing 3R principle

(replacement, reduction, refinement), the aim was to develop alternative *in vitro* methods that would enable the same level of protection as *in vivo* research after successful validation process. Therefore, special emphasis was placed on cell cultures used in toxicology studies. This review paper gives insight into the cell cultures used in such assays, the most commonly used cytotoxicity assays as well as statistical models that can be used to determine the toxicity of a test compound. In addition, guidelines of the regulatory bodies according to which such research should be conducted are also presented in this paper.

Literatura – References

1. Srivastava S, Mishra S, Dewangan J, Divakar A, Pandey PK, Rath SK. Principles for In Vitro Toxicology. In: Dhawan A, Kwon S (eds). In Vitro Toxicology. Academic Press, 2018; 21–43.
2. Kaur G, Dufour JM. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2012; 2:1–5.
3. Sausville EA. Drug Discovery. In: Atkinson AJ, Huang SM, Lertora JJJ, Markey SP (eds). 3rd Edition. Principles of Clinical Pharmacology. Academic Press, 2012; 507–515.
4. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. Dostupno na: <https://caat.jhsph.edu/principles/het-toc>, datum pristupa 27.08. 2021.
5. Spielmann H, Liebsch M. Lessons learned from validation of in vitro toxicity test: From failure to acceptance into regulatory practice. *Toxicol In Vitro* 2001; 15(4–5):585–590.
6. Marx U, Sandig V. Drug Testing in vitro: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.
7. Spielmann H, Genschow E, Liebsch M, Halle W. Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. *Altern Lab Anim* 1999; 27(6):957–966.
8. Sarmiento B. Concepts and Models for Drug Permeability Studies. Cell and Tissue based In Vitro Culture Methods. 1st Edition. Woodhead Publishing, 2015.
9. Radojčić Redovniković I, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V. Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Hrvat čas prehrabenu tehnol Biotechnol Nutr* 2016; 11(3–4):169–175.
10. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Fifth Edition. John Wiley & Sons, Inc., 2005; 199–216.
11. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hartung T, et al. Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM task Force on Good Cell Culture Practice. *Altern Lab Anim* 2005; 33(3):261–287.
12. Guhr A, Kurtz A, Friedgen K, Löser P. Current State of Human Embryonic Stem Cell Research: An Overview of Cell Lines and Their Use in Experimental Work. *Stem Cells* 2006; 24(10):2187–2191.

13. Biswas A, Hutchins R. Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16:213–221.
14. Yang Z, Xiong HR. In vitro, Tissue-Based Models as a Replacement for Animal Models in Testing of Drugs at the Preclinical Stages. In: Ceccherini-Nelli L, Matteoli B (eds). *Biomedical Tissue Culture*. InTechOpen, 2012.
15. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8(3):443–450.
16. Hodgson E. Metabolic interactions of environmental toxicants in humans. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 112:349–372.
17. Lecluyse EL, Alexandre E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. In: Maurel P (eds). *Hepatocytes. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, 2010; str. 57–82.
18. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006; 160:171–177.
19. Donato MT, Tolosa L, Gomez-Lechon MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol* 2015; 1250:77–93.
20. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols* 2008; 3:1125–1131.
21. Riss TL, Moravec RA, Niles AL. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods Mol Biol* 2011;740:103–114.
22. Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* 2014; 979:65–70.
23. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* 2020; 1:332–349.
24. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: Larramendy ML, Soloneski S (eds). *Genotoxicity, A Predictable Risk to Our Actual World*, IntechOpen, 2018; str: 1–17.
25. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics* 2011; 10(2):128–134.
26. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One* 2015;10(12): e0146021.
27. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring. Dostupno na: https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm#GLP_consensus_documents, datum pristupa 08.09.2021.

Primljeno 28. rujna 2021.