

# Možnosti studia transendoteliální migrace *in vitro*

## Techniques to Study Transendothelial Migration *In Vitro*

Knopfová L.<sup>1</sup>, Bouchal P.<sup>2</sup>, Šmarda J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

<sup>2</sup> Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

Nejzávažnější komplikací nádorových onemocnění je vznik vzdálených metastáz. K šíření do vzdálených orgánů využívají nádorové buňky často krevní cirkulaci. Vstup do krevního oběhu a průchod stěnou kapiláry do cílového sekundárního místa umožňují kolonizaci jiných orgánů a vznik život ohrožujících metastáz. Průchod stěnou cévy (transendoteliální migrace) je zásadní krok metastatické kaskády a poznání mechanismů řídících tento proces by jistě přispělo k vytváření nových strategií pro cílenou proti-metastatickou terapii. Existuje několik způsobů, jak studovat transendoteliální migraci v živých modelových organizmech (*in vivo*). Jejich výhodou je, že poskytují komplexní fyziologické mikroprostředí, jsou ale nákladné a technicky náročné. Proto se používají stále dokonalejší techniky pro sledování transendoteliální migrace *in vitro*. Jsou obecně dostupnější a méně náročné na vybavení, ale i v rámci metod studia transendoteliální migrace *in vitro* existuje značná variabilita ve složitosti provedení, požadavcích na speciální přístrojové vybavení, přesnosti simulace podmínek *in vivo* a v relevanci pro onkologické aplikace. Technické přístupy ke studiu transendoteliální migrace *in vitro*, jejich rozdělení, modifikace, výhody a nevýhody jsou předmětem tohoto přehledového článku.

### Klíčová slova

transendoteliální migrace – extravazace – endoteliální buňky – metastáza – transwell systém

### Summary

The most dangerous aspect of cancer is the metastatic spread to other parts of the body. Cancer cells frequently use circulation to spread to secondary locations. By entering the bloodstream (in a process called intravasation) and by crossing the vessel walls at the metastatic sites (extravasation) tumor cells disseminate to distal organs and eventually form life-threatening metastases. Crossing the vessel walls (transendothelial migration) is a vital step of metastatic cascade and the elucidation of mechanisms involved in transendothelial migration might inspire new strategies of targeted anti-metastatic therapy. There are several methods to study transendothelial migration in living models (*in vivo*). Although they offer complex physiological microenvironment, they are expensive and technically demanding, therefore not widely used. As an alternative, sophisticated techniques to investigate transendothelial migration *in vitro* have been developed. They are generally more available and feasible, but there is still considerable variability in the difficulty of performance, the requirements for specialized devices, accuracy of *in vivo* simulation and relevance for oncological applications. The classification, various modifications, pros and cons of *in vitro* techniques for studying transendothelial migration are summarized in this review.

### Key words

transendothelial migration – extravasation – endothelial cells – metastasis – transwell system

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Lucia Knopfová, Ph.D.

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta MU

Kotlářská 2

611 37 Brno

e-mail: knopfova@sci.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 2. 2014

Přijato/Accepted: 27. 3. 2014

## Úvod

Transendoteliální migrace (diapedéza) je proces průchodu buněk přes endotel. Může vést oběma směry: buňka může směřovat z lumen cévy/kapiláry do parenchymu cílového orgánu (extravazace), nebo naopak vstupovat ze subendoteliální tkáně do cirkulace (intravazace). Fyziologicky k ní dochází např. během zánětu, kdy leukocyty přitahované prozánětlivými molekulami vystupují z krevního řečiště do poškozené tkáně. U nádorových onemocnění dochází k interakci s endotelem během angiogeneze a metastatického šíření nádoru. Do míst vzdálených primárnímu tumoru jsou nádorové buňky často distribuovány krevním systémem, což předpokládá dvojí průnik nádorových buněk endoteliální bariérou. Invazivní buňky unikají z tkáně primárního karcinomu do krevního řečiště, přežívají jako cirkulující nádorové buňky, v cílovém místě prostupují stěnou kapiláry a v novém mikroprostředí mohou přežívat ve stavu dormance, případně dát vznik sekundárnímu nádoru [1].

Molekulární mechanismy řídící interakci nádorových buněk s endotelem jsou tedy s ohledem na potenciální terapeutické využití a prevenci metastatického rozsevu předmětem intenzivního výzkumu. Zkoumání transendoteliální migrace (TEM) *in vivo* je znesnadněno tím, že se jedná o proces probíhající uvnitř tkání organismu, v komplexním mikroprostředí a často v obtížně predikovatelných místech [2]. Nicméně pro studium intravazace lze využít zobrazovací techniky intravitální mikroskopie, extravazaci *in vivo* je možné hodnotit z hlediska účinnosti na úrovni buněčných populací podle přítomnosti značených buněk v parenchymu cílových orgánů [3–5]. Nedostatky těchto strategií, jako jsou špatné prostorové rozlišení intravitální mikroskopie, nákladnost, nutnost použití modelových zvířat a jejich výběr, vyvažuje komplexní fyziologické mikroprostředí TEM. Alternativu těmto přístupům *in vivo* nabízejí systémy pro sledování TEM *in vitro*, jejichž rozdělení a popis je předmětem tohoto přehledového článku.

## Možnosti studia transendoteliální migrace *in vitro*

Techniky pro studium TEM *in vitro* lze rozdělit podle substrátu, na němž se for-

muje vrstva endoteliálních buněk (endotelial cell – EC). Některé techniky využívají tzv. transwell systém, kdy EC pokrývají porézní polyesterovou nebo polykarbonátovou membránu, jiné zajišťují 3D kultivační podmínky, obvykle reprezentované 3D kolagenovým gelem převrstveným endoteliálními buňkami. Podle způsobu monitorování TEM *in vitro* se rozlišují metody mikroskopické a nemikroskopické. Mikroskopické i nemikroskopické metody sledování TEM můžeme dále rozdělit na ty, které analyzují jeden (konečný) časový bod procesu, a na ty, které umožňují zaznamenávat TEM v reálném čase (časosběrná mikroskopie nebo monitorování změn impedance). Podle dalšího kritéria se rozlišují statické systémy TEM *in vitro*, systémy fluidní a třepací („rocking“) [6–8]. Níže budou popsány jednotlivé techniky studia TEM *in vitro* a jejich modifikace.

### Statické systémy

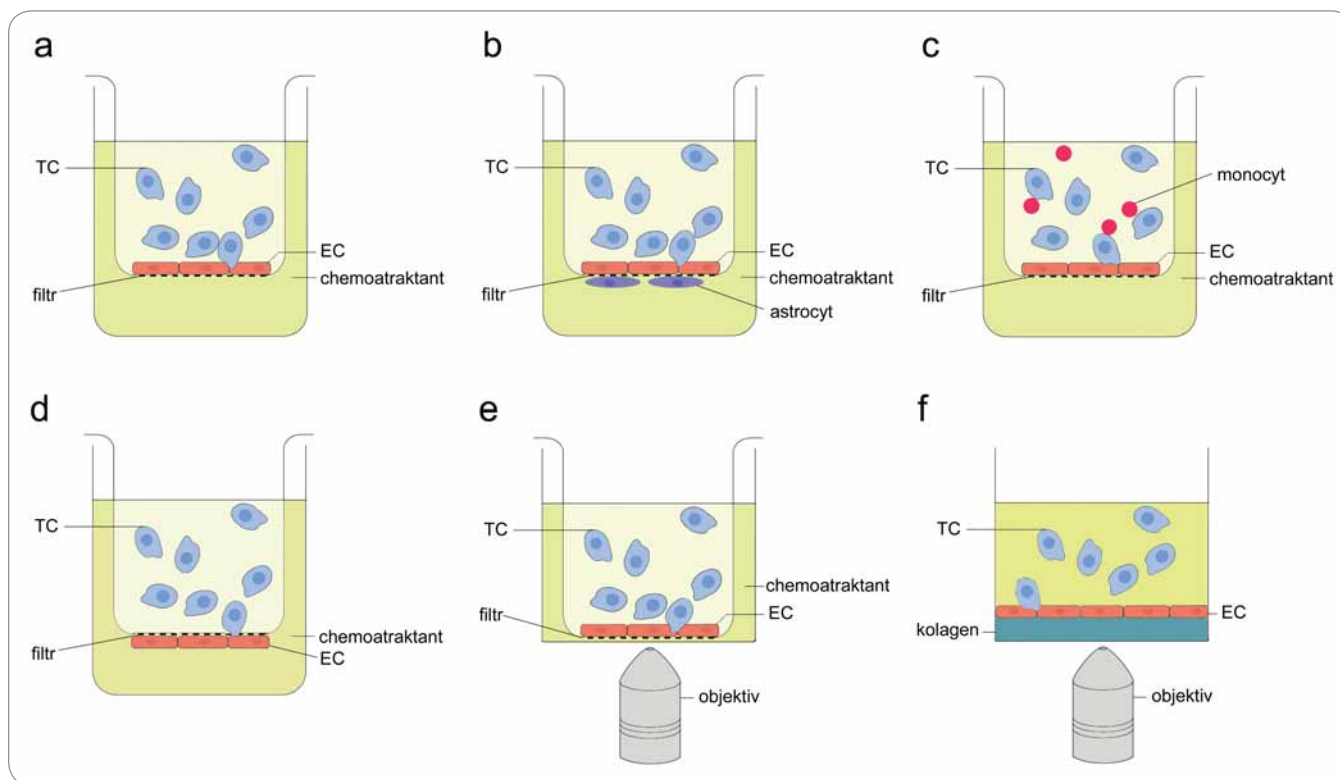
#### Transwell techniky pro sledování transendoteliální migrace

Základní transwell systém pro sledování TEM (obr. 1A) sestává z dvoukomorové kultivační jamky přehrazené porézním filtrem (velikost pórů obvykle 5–8 μm) [9–11]. Na horní stranu filtru jsou nasazeny EC, přitom adhezivní vlastnosti membrány jsou obvykle zlepšeny předchozím ošetřením roztoky obsahujícími složky extracelulární matrix (ECM), jako jsou fibronektin, vitronektin, kolagen, matrigel nebo želatina, za vzniku tenké vrstvy ECM [5,9,12,13]. Používají se různé typy EC: komerčně dostupné lidské EC z pupečnickové žíly (HUVEC) [10,14], primární lidské mikrovaskulární EC z různých orgánů [11,15], EC z aorty (HAEC) [16], imortalizovaná linie myších EC z pankreatu (MS1) [17], primární myší mikrovaskulární EC izolované z různých orgánů [5,8]. Jakmile EC zaplní plochu membrány a dosáhnou konfluence, což lze ověřit testem na permeabilitu EC pomocí dextranu konjugovaného s fluoroforem nebo měřením transendoteliální elektrické rezistence (TEER) [18,19], přidají se do horní části nádorové buňky. Spodní část jamky je naplněna médiem s chemoatraktantem podporujícím vstup nádorových buněk vrstvou endotelu a membránou. TEM se obvykle

vyhodnocuje 4–24 hodin po přidání nádorových buněk (časový bod pro zastavení TEM je nutno stanovit empiricky pro každou kombinaci buněčných linií) [9,12,14,20]. Hodnotí se přítomnost nádorových buněk na spodní straně membrány, případně ve spodní části transwell jamky [5,9]. Četnost buněk se posuzuje vizuálně po fixaci, případně po barvení (pokud nejsou označeny předem) [12,14,21], nebo se kvantifikace provádí fluorimetricky, event. průtokovou cytometrií při značení buněk fluorescenčními sondami [13,20,22]. Toto výchází uspořádání transwell experimentu je snadno sestavitelné, nevyžaduje speciální vybavení, umožňuje kvantifikaci, ale nenabízí možnost pozorovat jednotlivé fáze TEM.

Používají se proto i různé modifikace tohoto přístupu vyvažující některé nedostatky. Jako alternativní způsob hodnocení TEM (k „end-point“ detekci) lze použít odečítání změn impedance na spodní straně membrány transwell jamky. Kromě přístrojového vybavení (např. xCELLigence real time cell analyzer) jsou k tomu nezbytné speciálně upravené transwell jamky (CIM-plates) obsahující mikroelektrody na spodní straně membrány. Nádorové buňky procházející vrstvou EC a póry v membráně se dostávají do kontaktu s mikroelektrodami. Jejich přítomnost způsobuje změnu impedance a ta se odečítá v libovolných časových intervalech. Poměrně k počtu transmigrujících buněk narůstá v čase buněčný index odpovídající změně impedance, což umožňuje monitorování TEM v reálném čase (Knopfová et al, dosud nepublikováno). Pro rozlišení signálu generovaného samotnými EC je nutno jako kontrolu měřit impedanci v jamkách, do kterých nebyly přidány nádorové buňky.

Další možnost, jak zachytit dynamiku interakce nádorových a endoteliálních buněk během TEM na transwell membránách, nabízí mikroskopie. Inzerty s membránami (horní část transwell jamky) pokrytými EC jsou po přidání suspenze označených nádorových buněk položeny na misky se skleněným dnem (obr. 1E). Během inkubace ve vyhřívané komoře mikroskopu jsou v pravidelných intervalech snímány buňky v růz-



**Obr. 1. Schematické znázornění statických systémů pro detekci TEM.**

A. Základní složky transwell systému TEM; B. transwell model krevně-mozkové bariéry; C. modifikace transwell metodiky: TEM v přítomnosti krevních buněk; D. transwell model pro studium intravazace *in vitro*; E. transwell insert v misce se skleněným dnem pro mikroskopickou detekci TEM; F. 3D model TEM.

TC – nádorová buňka, EC – endoteliální buňka

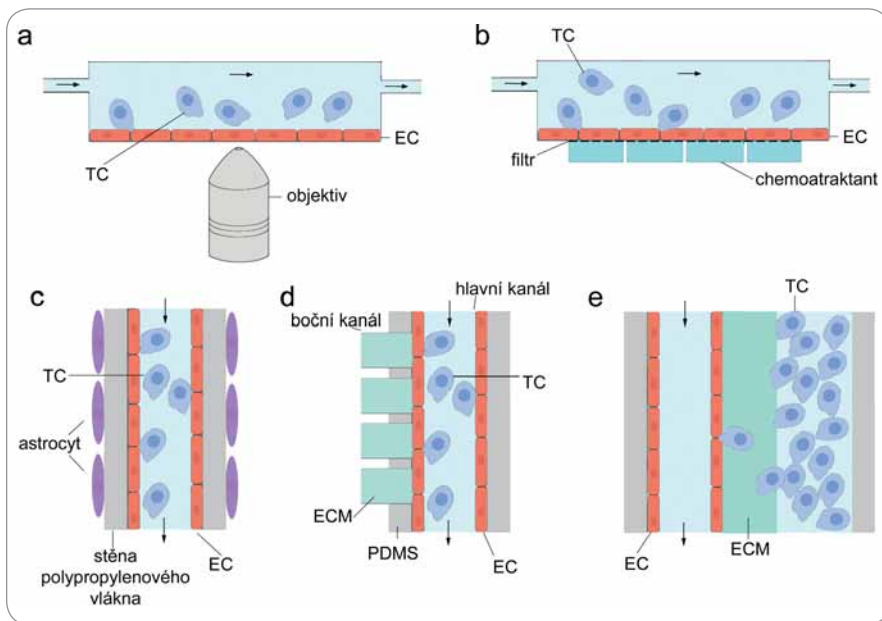
ných rovinách vzorku (nad membránou, v úrovni membrány i pod ní) [23]. Tento přístup dovoluje zachytit buňky v jednotlivých krocích během migrace přes endotel a membránu i sekvenci těchto kroků. Takto bylo zjištěno, že mezenchymální kmenové buňky procházejí mezi EC (nikoli skrz EC) dočasně vytvořenými mezerami, které se nad transmigrující buňkou zacelují [23]. Zobrazovací techniky se však potýkají se špatnými optickými vlastnostmi transwell membrány, zajištění dostatečného rozlišení vyžaduje velmi nákladné vybavení (konfokální mikroskop pro snímání živých buněk a objektiv s dlouhou pracovní vzdáleností).

Transwell systém lze modifikovat pro speciální účely, např. pro simulaci krevně-mozkové bariéry (obr. 1B). Malin et al. upravitel transwell uspořádání pro kokultivaci EC a astrocytů – na spodní část transwell membrány aplikovali primární lidské astrocyty, po je-

jich přisednutí insert obrátili a do horní části nasadili linii lidských mikrovaskulárních EC z mozku (HBMEC) [11]. Podobně jako při výchozích transwell testech byly po dosažení konfluencie EC ke kokultuře přidány značené nádorové buňky a po čase vyhodnocena jejich přítomnost na spodní části insertu [11]. Jednodušší verze pokusu vynechává kultivaci astrocytů pod vrstvou EC a pro napodobení krevně-mozkové bariéry se bazální pól primárních EC z mozku vystavuje médiu, v němž byly astrocyty kultivovány [19], případně se astrocyty nasadí na dno spodní části transwell jamky [24]. Faktory sekretované astrocyty podporují utěsnění adhezivních spojů mezi EC [19].

Obrácené pořadí jednotlivých vrstev v transwell testech TEM lze využít pro modelování intravazace (obr. 1D). V klasické transwell sestavě přicházejí nádorové buňky nejdříve do kontaktu s apikální (luminální) stranou EC, poté

procházejí skrz subendoteliální ECM a membránu. Toto uspořádání simuluje extravazaci *in vivo*, kdy nádorové buňky opouští lumen cévy, interagují s EC a následně s bazální membránou obklopující cévu. Protože schopnost extravazace a intravazace nejsou funkčně ekvivalentní [1], používá se pro testování intravazace *in vitro* transwell insert, jehož spodní strana je upravena tenkou vrstvou ECM a překryta EC [10]. Po inkubaci nutné k získání celistvé vrstvy EC se insert obrátí a horní část se naplní suspenzí nádorových buněk. Spodní část slouží jako rezervoár kultivačního média s chemoatraktantem, případně s jinými testovanými látkami. Takto vstupují nádorové buňky nejdříve do kontaktu se subendoteliální vrstvou ECM a s bazálním pólem EC [10]. Orientace nádorových a endoteliálních buněk tak odpovídá situaci *in vivo* během intravazace, kdy izolovaná buňka nádoru vniká z extraluminálního prostoru do cirkulace.



**Obr. 2. Schematické znázornění fluidních systémů pro detekci TEM.**

A. Paralelní fluidní model, boční pohled; B. transwell průtokový systém, boční pohled; C. kapilární fluidní model krevně-mozkové bariéry, pohled shora; D. kapilární mikrofluidní zařízení pro sledování extravazace, pohled shora; E. kapilární mikrofluidní systém pro sledování intravazace, pohled shora.

TC – nádorová buňka, EC – endoteliální buňka, PDMS – polydimetylsiloxan, ECM – extracelulární matrix

Kromě astrocytů mohou být tradiční transwell TEM experimenty obohaceny dalším typem buněk, monocytů [5]. Bylo prokázáno, že myeloidní buňky se aktivně účastní TEM a diseminace nádorů *in vivo* [5,25,26]. Přítomnost leukocytů v kokultuře nádorových a endoteliálních buněk přispívá k simulaci fyziologicky relevantních podmínek extravazace. Postup i složky transwell experimentu zůstávají stejné, jen se do horní části jamky k suspenzi nádorových buněk přidá pětinašobné množství monocytů (obr. 1C). Tato varianta transwell systému pomáhá lépe odhadovat metastatickou aktivitu buněk *in vivo*. Například nádorové buňky MC-38 neschopné za normálních podmínek migrovat vrstvou primárních EC procházejí endotelem v přítomnosti primárních monocytů izolovaných z kostní dřeně myši [5].

### Trojrozměrné modely transendoteliální migrace *in vitro*

Zatímco transwell systémy se pro svou jednoduchost hojně používají pro kvantifikaci TEM *in vitro*, nefyziologická bariéra, jakou je porézní membrána, kom-

plikuje získání informací o morfologii buněk, organizaci biomembránových struktur a/nebo mezibuněčných kontaktů během jednotlivých fází TEM [27]. Deformaci buněk během průchodu transwell membránou je možno předejít použitím trojrozměrných gelů jako substrátů pro formování monovrstvy EC [27,28] (obr. 1F). Jako 3D fibrilární matrix se obvykle používá extrakt bazální membrány (matrigel) [15] nebo kolagen typu I [22,28], který v neutrálním pH a při teplotě 37 °C tuhne za vzniku průsvitné gelové struktury, jejíž pevnost je dána koncentrací kolagenu. Tloušťka gelu limituje rozlišení, pro vyšší rozlišení (63–100× objektiv) jsou nezbytné gely tenčí než 100 μm [28]. Roztok kolagenu nebo matrigelu se aplikuje na kultivační misku se skleněným dnem, po ztuhnutí se povrch gelu může ještě upravit fibronectinem a na něj se v požadované hustotě nasadí EC [29]. Růst EC lze snadno vizuálně kontrolovat. Ke konfluentním buňkám se přidá suspenze značených testovaných buněk. Ke značení se používají fluorescenční sondy permeabilní pro membránu živých buněk,

jako je CellTrace™, CellTracker™, Calcein AM, karboxyfluorescein diacetát sukcinimidyl ester CFSE, případně transfekce plazmidy kódujícími fluorescenční proteiny [15,22,28]. Je možné takto označit také specifické buněčné struktury, např. F-actin pomocí LifeAct peptidu konjugovaného s fluorescenční značkou, a sledovat tak dynamickou distribuci cílového proteinu během TEM [28].

Vyhodnocení TEM spočívá ve snímání několika rovin kokultury (nad i pod úrovní EC) konfokálním mikroskopem a následné analýze obrazu, která umožňuje i jistou míru kvantifikace. Pro porovnání míry TEM se stanoví četnost buněk nad a pod vrstvou EC [22]. Kromě účinnosti TEM se dají sledovat další parametry, jako je polarizace buněk, forma diapedézy (transcelulární nebo paracelulární), formování membránových struktur a jiné [30]. Videomikroskopicky lze snímat jedno místo vzorku v čase, nebo lze buňky v požadovaném časovém intervalu fixovat a použitím specifických protilátek určit subcelulární distribuci a/nebo kolokalizaci sledovaných proteinů [22,28]. S použitím 3D modelu TEM se podařilo zachytit dramatické změny tvaru transmigrujících buněk doprovázené reorganizací aktinového cytoskeletu a charakterizovat stadia extravazace *in vitro* [15].

## Fluidní systémy

### Paralelní průtokové modely

Oba popsané modely (transwell i 3D) patří do skupiny statických systémů pro sledování TEM *in vitro*. To znamená, že v nich nedochází k proudění tekutiny, která by simulovala cirkulaci krve uvnitř cév. Proudění nosné tekutiny a tzv. smykové napětí (shear stress) nicméně významně ovlivňují morfologické i funkční charakteristiky EC, adhezi cirkulujících nádorových buněk ke stěně cévy a transmigraci [31]. Proto byly vytvořeny fluidní systémy pro výzkum TEM.

Nejjednodušší fluidní systém se skládá z kultivační komůrky s otvory pro přítok a odtok média (parallel-plate flow chamber) [13] (obr. 2A). Na dno průtokové komůrky se vkládá sklo (předem ošetřené některou složkou ECM) pokryté vrstvou EC. Do komůrky je pumpou vtačováno médium (rychlost proudění je re-

gulována), do něj se přidá studovaná buněčná populace a mikroskopicky se hodnotí adheze k EC při různé vysokém smykovém napětí (0,5–40 dyn/cm<sup>2</sup>, fyziologický rozsah v mikrovaskulatuře 0,5–5 dyn/cm<sup>2</sup>, ve velkých cévách 10–40 dyn/cm<sup>2</sup>) [13,16,32,33].

I fluidní systémy poskytují prostor pro obohacení kokultury EC a nádorových buněk o další buněčné typy. Začlenění monocytů do průtokových modelů TEM se ukazuje jako výhoda při snaze předvídat chování buněk *in vivo*. Například metastatické buňky prsního karcinomu (linie MDA-MB-231) interagují v průtokových podmínkách s endotelem *in vitro* výhradně v přítomnosti monocytů, s nimiž tvoří stabilní agregáty [16]. Monocyty takto asistují nádorovým buňkám vystaveným hemodynamickému působení při zachycení na vrstvě EC [16].

#### Transwell průtokový model

S podobným výsledkem byla testována TEM buněk melanomu v přítomnosti krevních buněk [34,35]. Kromě fluidního modelu popsaného výše použili Dong et al transwell kulturační systém adaptovaný pro průtokové podmínky – porézní membrána tvoří substrát pro EC, prostor pod membránou slouží jako zásobárna chemoatraktantu, prostor nad membránou je uzavřen a otvory v horní části se vhání a odtéká médium se suspenzí nádorových a krevních buněk (obr. 2B) [34]. Tento transwell fluidní systém umožňuje sledovat migraci skrz vrstvu EC, zatímco paralelní průtokový systém zaznamenává adhezi nádorových buněk k EC a interkalaci. TEM buněk melanomu je v průtokových podmínkách ve srovnání se statickými podmínkami zhoršena, nicméně ji významně stimuluje interakce s krevními neutrofily [34,35].

#### Kapilární průtokové modely

Fluidní systém, který by sloužil jako model krevně-mozkové bariéry *in vitro*, navrhli Cucullo et al [32,36]. Trojrozměrný průtokový model, jenž zahrnuje luminální působení smykového napětí na mozkové EC i abluminální vliv astrocytů, umožňuje reprodukovat fyziologické a biochemické vlastnosti intaktní krevně-mozkové bariéry (obr. 2C) [36]. Nosnou konstrukci původního modelu

tvoří polypropylenové duté vlákno vložené do uzavřené komůrky s otvory pro přísun a odtok média a se skleněným dnem. Dvnitř vlákna jsou injikovány EC tak, aby po přisednutí a dělení tvořily výstelku dutiny. Do extraluminálního prostoru jsou aplikovány astrocyty, které pak pokrývají vlákno z vnější strany. Do vlákna je pumpou vtačováno médium a silikonové trubice zajišťují výměnu CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. Vnitřní průměr vlákna je asi 600 μm a tloušťka stěny 200 μm. Průměr pórů ve stěně vlákna může být až 4 μm, což umožňuje extravazaci buněk z lumen kapiláry [32]. Výhoda tohoto dynamického systému je zajištění kontrolovaného 3D růstu buněčných složek krevně-mozkové bariéry v průtokovém systému umělých kapilár. Pro výzkum TEM nádorových buněk nebyl tento model dosud významně využíván.

Propracovaný mikrofluidní model TEM, který zahrnuje všechny základní složky mikroprostředí krevní kapiláry *in vivo* (dutinu s výstelkou EC, proudění média a smykové napětí, perivaskulární 3D ECM), vytvořili Zhang et al [6]. Mikrofluidní zařízení představuje skleněná podložka pokrytá vrstvou polydimetylsiloxanu, průsvitným organickým polymerem s vysokou propustností pro plyny. V něm je vytvořena soustava kanálků – hlavní kanál s otvory pro přítok a odtok média, do něhož kolmo ústí několik bočních kanálků (obr. 2D). Tyto jsou následně až po ústí do hlavního kanálu naplněny matrigelem (nebo jiným hydrogelem simulujícím ECM) a slouží jako perivaskulární matrix. Hlavní kanál je po všech stranách vystlán EC, proudí jím médium a simuluje dutinu cévy. TEM je monitorována v místě, kde boční kanálky ústí do hlavního. Tam nádorové buňky (označené fluorescenční sondou) aplikované do média nemusejí překonávat žádné umělé bariéry a vstupují do kontaktu pouze s (jinak fluorescenčně značenými) EC a subendoteliální ECM. V matrix bočních kanálků je navíc možno vytvořit gradient libovolných chemoatraktantů a zkoumat tak jejich vliv na účinnost TEM [6]. Podobný design mikrofluidního systému, kdy nádorové buňky unášené proudem média interagují s EC a migrují skrz ně do 3D matrix tvořené kolagenem typu I, využili Jeon et al pro mode-

lování extravazace *in vitro* [7]. Přejichod z dutiny kanálu vytvořeného v polydimetylsiloxanu přes vrstvu EC do hydrogelu v bočním kanálku podstoupí 39 % injikovaných nádorových buněk linie MDA-MB-231 během prvních 24 hodin [7].

Pro sledování intravazace za fluidních podmínek v 3D mikroprostředí existuje speciální systém, který reprodukuje rozhraní mezi primárním nádorem a endotelem a umožňuje mikroskopii v reálném čase a ve vysokém rozlišení [37]. Systém dvou paralelních mikrokanálků, jež jsou propojeny vrstvou kolagenového gelu, dovoluje nezávislé nasazení endoteliálních a nádorových buněk (obr. 2E). EC formují uvnitř kanálu dutou 3D kapilární strukturu, nádorové buňky invadují hydrogel, narážejí na bazální stranu EC a transmigrují do dutiny paralelního kanálku. Systém umožňuje regulovat průtok, obohacovat mikroprostředí dalšími buněčnými typy, např. makrofágy, vytvářet koncentrační gradient testovaných látek a napodobovat tak situaci doprovázející intravazaci *in vivo* [37]. Takto se podařilo prokázat, že endotel funguje jako bariéra v migraci nádorových buněk, jejíž permeabilita může být modulována faktory sekretovanými primárním nádorem [37].

#### Třepací („rocking“) systém pro analýzu transendoteliální migrace

Protože fluidní modely často vyžadují speciální vybavení a nejsou snadno dostupné, navrhli Bapu et al nahradit jednosměrný proud tekutiny obousměrným, který by v kulturačních nádobkách vznikl kýváním nebo třepáním [8]. Jejich model umožňuje mikroskopicky hodnotit míru adheze nádorových buněk k EC rostoucím v monovrstvě na skleněném povrchu [8]. Usuzujeme, že podobného efektu se stejnými výhodami by se docílilo s použitím transwell jamek vystavených po dobu dvou a více hodin kývání, a tedy proudění média.

#### Závěr

Existuje řada metodických přístupů ke studiu TEM *in vitro*. Transwell systémy jsou upřednostňovány pro jednoduchost a dostupnost při prvotních odhadech míry TEM různých typů buněk,

nebo za působení širokého spektra různých látek. Složitější statické modely jsou nezbytné pro zachycení dynamiky TEM, případně pro identifikaci fáze procesu, která byla zasažena za testovaných podmínek. Fluidní systémy, zejména kapilární, zlepšují *in vitro* možnosti rekapitulace komplexních fyziologických podmínek *in vivo*, a tím pomáhají lépe odhadovat výsledky experimentálních zásahů v živém organismu. Stále dokonalejší techniky pro detekci TEM *in vitro* reprezentují nezbytnou alternativu k postupům *in vivo*, jež nabízejí výsledky relevantní pro klinické aplikace, ale nejsou pro svou nákladnost a experimentální náročnost vždy dostupné. Protože interakce nádorových buněk a endotelu determinují úspěšnost nádorové diseminace, představují potenciální cíl proti-metastatické terapie a mechanismy regulující TEM jsou tak významným tématem onkologického výzkumu.

## Literatura

- Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(12): 858–870. doi: 10.1038/nrc3628.
- Stoletov K, Kato H, Zardoujian E et al. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 13): 2332–2341. doi: 10.1242/jcs.069443.
- Wyckoff JB, Jones JG, Condeelis JS et al. A critical step in metastasis: *in vivo* analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 2000; 60(9): 2504–2511.
- Gligorijevic B, Wyckoff J, Yamaguchi H et al. N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 3): 724–734. doi: 10.1242/jcs.092726.
- Wolf MJ, Hoos A, Bauer J et al. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell* 2012; 22(1): 91–105. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.023.
- Zhang Q, Liu T, Qin J. A microfluidic-based device for study of transendothelial invasion of tumor aggregates in realtime. *Lab Chip* 2012; 12(16): 2837–2842. doi: 10.1039/c2lc00030j.
- Jeon JS, Zervantonakis IK, Chung S et al. *In vitro* model of tumor cell extravasation. *PLoS One* 2013; 8(2): e56910. doi: 10.1371/journal.pone.0056910.
- Bapu D, Khadim M, Brooks SA. Rocking adhesion assay system to study adhesion and transendothelial migration of cancer cells. *Methods Mol Biol* 2014; 1070: 37–45. doi: 10.1007/978-1-4614-8244-4\_3.
- Zen K, Liu DQ, Guo YL et al. CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One* 2008; 3(3): e1826. doi: 10.1371/journal.pone.0001826.
- Peyri N, Berard M, Fauvel-Lafeve F et al. Breast tumor cells transendothelial migration induces endothelial cell anoikis through extracellular matrix degradation. *Anticancer Res* 2009; 29(6): 2347–2355.
- Malin D, Strekalova E, Petrovic V et al. αB-crystallin: a novel regulator of breast cancer metastasis to the brain. *Clin Cancer Res* 2014; 20(1): 56–67. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1255.
- Ma C, Rong Y, Radloff DR et al. Extracellular matrix protein betaig-h3/TGFBI promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation. *Genes Dev* 2008; 22(3): 308–321. doi: 10.1101/gad.1632008.
- Haddad O, Chotard-Ghodsnia R, Verdier C et al. Tumor cell/endothelial cell tight contact upregulates endothelial adhesion molecule expression mediated by NFκappaB: differential role of the shear stress. *Exp Cell Res* 2010; 316(4): 615–626. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.11.015.
- Li J, Guillebon AD, Hsu JW et al. Human fucosyltransferase 6 enables prostate cancer metastasis to bone. *Br J Cancer* 2013; 109(12): 3014–3022. doi: 10.1038/bjc.2013.690.
- Voura EB, English JL, Yu HY et al. Proteolysis during tumor cell extravasation *in vitro*: metalloproteinase involvement across tumor cell types. *PLoS One* 2013; 8(10): e78413. doi: 10.1371/journal.pone.0078413.
- Evani SJ, Prabhu RG, Gnanaruban V et al. Monocytes mediate metastatic breast tumor cell adhesion to endothelium under flow. *FASEB J* 2013; 27(8): 3017–3029. doi: 10.1096/fj.12-224824.
- Kim C, Lee HS, Lee D et al. Epithin/PRSS14 proteolytically regulates angiopoietin receptor Tie2 during transendothelial migration. *Blood* 2011; 117(4): 1415–1424. doi: 10.1182/blood-2010-03-275289.
- Ma C, Wang XF. *In vitro* assays for the extracellular matrix protein-regulated extravasation process. *CSH Protoc* 2008. doi: 10.1101/pdb.prot5034.
- Fazakas C, Wilhelm I, Nagyoszi P et al. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One* 2011; 6(6): e20758. doi: 10.1371/journal.pone.0020758.
- Haidari M, Zhang W, Wakame K. Disruption of endothelial adherens junction by invasive breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species and is attenuated by AHCC. *Life Sci* 2013; 93(25–26): 994–1003. doi: 10.1016/j.lfs.2013.10.027.
- Leroy-Dudal J, Demeilliers C, Gallet O et al. Transmigration of human ovarian adenocarcinoma cells through endothelial extracellular matrix involves alpha v integrins and the participation of MMP2. *Int J Cancer* 2005; 114(4): 531–543.
- Reymond N, Im JH, Garg R et al. Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through β1 integrin. *J Cell Biol* 2012; 199(4): 653–668. doi: 10.1083/jcb.201205169.
- Matsushita T, Kibayashi T, Katayama T et al. Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci Lett* 2011; 502(1): 41–45. doi: 10.1016/j.neulet.2011.07.021.
- Díaz-Coránguez M, Segovia J, López-Ornelas A et al. Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. *PLoS One* 2013; 8(4): e60655. doi: 10.1371/journal.pone.0060655.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010; 141(1): 39–51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
- Hoos A, Protsyuk D, Borsig L. Metastatic growth progression caused by PSGL-1-mediated recruitment of monocytes to metastatic sites. *Cancer Res* 2014; 74(3): 695–704. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0946.
- Cain RJ, d'Água BB, Ridley AJ. Quantification of transendothelial migration using three-dimensional confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 2011; 769: 167–190. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6\_12.
- Estecha A, Sánchez-Martín L, Puig-Kröger A et al. Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 19): 3492–3501. doi: 10.1242/jcs.053157.
- Muller WA, Lusinskas FW. Assays of transendothelial migration *in vitro*. *Methods Enzymol* 2008; 443: 155–176. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02009-0.
- Carman CV. High-resolution fluorescence microscopy to study transendothelial migration. *Methods Mol Biol* 2012; 757: 215–245. doi: 10.1007/978-1-61779-166-6\_15.
- Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81(3): 177–199.
- Cucullo L, Marchi N, Hossain M et al. A dynamic *in vitro* BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31(2): 767–777. doi: 10.1038/jcbfm.2010.162.
- Adams Y, Rowe JA. The effect of anti-rosetting agents against malaria parasites under physiological flow conditions. *PLoS One* 2013; 8(9): e73999. doi: 10.1371/journal.pone.0073999.
- Dong C, Slattery MJ, Liang S et al. Melanoma cell extravasation under flow conditions is modulated by leukocytes and endogenously produced interleukin 8. *Mol Cell Biomech* 2005; 2(3): 145–159.
- Liang S, Slattery MJ, Wagner D et al. Hydrodynamic shear rate regulates melanoma-leukocyte aggregation, melanoma adhesion to the endothelium, and subsequent extravasation. *Ann Biomed Eng* 2008; 36(4): 661–671. doi: 10.1007/s10439-008-9445-8.
- Cucullo L, McAllister MS, Kight K et al. A new dynamic *in vitro* model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. *Brain Res* 2002; 951(2): 243–254.
- Zervantonakis IK, Hughes-Alford SK, Charest JL et al. Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(34): 13515–13520. doi: 10.1073/pnas.1210182109.