

**UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**



**Diplomová práce**

**Vývoj 3D sférických buněčných modelů odvozených od buněčných linií  
lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a myšního karcinomu tlustého  
střeva CT-26**

**Bc. Magdaléna Kozlíková**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2021**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 15. 5. 2021

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména vedoucímu mé práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a čas, který mi věnoval při vypracování této práce. Chtěla bych poděkovat i za možnost pracovat ve vědecké skupině prof. PharmDr. Tomáše Šimůnka, Ph.D. spolupracující se skupinou prof. PharmDr. Petra Zimčíka, PhD. Děkuji za dva roky v přátelském a ochotném kolektivu. Za pomoc při přípravě tkáňových řezů bychom rádi poděkovali prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. Ráda bych poděkovala rodině a přátelům za podporu a trpělivost při studiu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Grantové agentuře České republiky (projekt 19-14758Y) za finanční podporu.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Magdaléna Kozlíková

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Název diplomové práce: Vývoj 3D sférických buněčných modelů odvozených od buněčných linií lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a myšího karcinomu tlustého střeva CT26

Fotodynamická terapie (PDT) se v posledních desetiletích stala předmětem intenzivního výzkumu v kontextu experimentálních modelů nádorů, zejména pro léčbu solidních tumorů. Studie se hlavně zaměřují na výzkum nových fotosenzitizérů (PS), které by měly poskytnout lepší účinnost, vyšší specifitu pro nádor a nižší toxicitu pro nemaligní tkáň. PDT je založeno na interakci PS, přítomnosti molekulárního kyslíku a světla, vedoucího ke vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) vyvolávající poškození nádorové tkáně. 3D nádorové modely by měly poskytovat lepší nástroj pro studium mikros prostředí nádoru, protinádorových léčiv nebo terapeutických přístupů. Proti 2D buněčným kulturám více napodobují *in vivo* mezibuněčné interakce a interakce buněk s extracelulární matrix.

V naší práci jsme studovali cytotoxicitu originálních ftalocyaninových PS s označením P40, P44 a ZIP300 a klinicky využívanou látkou PhotoSens® na 3D sféroidních buněčných kulturách odvozených od buněčných linií CT-26 a MCF-7 vytvořené za použití destiček s nízkou adhezivitou (ULA). Studovali jsme také invazivní chování sféroidů po PDT se studovanými látkami. Konfokální mikroskopií byla studována distribuce PSs ve sféroidech.

Životaschopnost buněk byla vyhodnocena dvěma metodami založenými na různých principech – redukcí resazurinu a stanovení aktivity ATP. Nejvyšší fototoxicitu u obou buněčných linií vykazovala amfifilní kationická látka P40. Invazivní potenciál byl prokázán u sféroidů odvozených z buněčné linie CT-26. Tyto sféroidy vystavené všem PSs vykazovaly po ozáření sníženou schopnost invazivity. Konfokální mikroskopie prokázala odlišnou distribuci PSs – zatímco P44 byla lokalizovaná především u povrchu sféroidu, ZIP300 byl lokalizován především v nekrotickém jádře. PhotoSens® a P40 byly lokalizovány v celém objemu sféroidu.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Magdaléna Kozlíková

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Title of diploma thesis: Development of 3D spheroid cultures derived from human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 and murine colon carcinoma cell line CT-26

In recent decades, photodynamic therapy (PDT) has become a topic of intensive research in the context of experimental models of tumors, especially for the treatment of solid tumors. The study mainly focuses on research of novel photosensitizers (PS), which should provide better efficacy, higher tumor specificity and lower toxicity to non-malignant tissue. PDT is based on the interaction of PS, the presence of molecular oxygen, and light, leading to the formation of reactive oxygen species causing damage of tumor tissue. 3D tumor spheroids should provide a better tool for the study of tumor microenvironment, anticancer drugs, or therapeutic approaches. In contrast to 2D cell cultures, they are mimicking *in vivo*-like cell-cell and cell-matrix interactions.

In our work, we studied the cytotoxicity of original phthalocyanine PSs designated P40, P44, ZIP300 and the clinically used compound PhotoSens<sup>®</sup> on 3D cell cultures derived from CT-26 and MCF-7 cell lines generated using an ultra-low adhesion plates. We have also studied the invasive behaviour of spheroids after PDT with the studied compounds. The distribution of PSs in spheroids was evaluated by confocal microscopy.

Cell viability was assessed by two methods based on different principles: reduction of resazurin and determination of ATP activity. The amphiphilic cationic compound P40 showed highest phototoxicity in both cell lines. Invasive potential has been demonstrated only in spheroids derived from the CT-26 cell line. These spheroids exposed to all PSs showed reduced ability of invasivity after irradiation. Confocal microscopy revealed a different distribution of PSs – while P44 was located mainly at the surface of the spheroid, ZIP300 was located mainly in the necrotic core. PhotoSens<sup>®</sup> and P40 were located throughout the whole spheroid volume.

# 1 OBSAH

1	OBSAH.....	7
2	ÚVOD.....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Fotodynamická terapie (PDT).....	10
3.1.1	Historie PDT .....	10
3.1.2	Mechanismus PDT .....	11
3.1.3	Dráhy buněčné smrti v PDT .....	13
3.1.4	Ochranné mechanismy nádorových buněk proti PDT .....	15
3.1.5	Světelné zdroje v PDT .....	16
3.1.6	Fotosenzitizéry .....	17
3.2	3D buněčné kultury .....	19
3.2.1	3D kultury: svět mezi <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> .....	19
3.2.2	Struktura 3D sféroidů.....	20
3.2.3	Interakce tumoru s mikroprostředím u 3D buněčných kultur.....	21
3.2.4	Proliferace .....	21
3.2.5	Migrace a invazivita.....	23
3.2.6	Odolnost vůči léčbě .....	25
3.2.7	Využití 3D kultur .....	26
3.2.8	Tvorba 3D modelů .....	31
4	CÍLE PRÁCE .....	39
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	40
5.1	Laboratorní vybavení pro práci s buněčnou linií .....	40
5.1.1	Pracovní pomůcky .....	40
5.1.2	Pracovní přístroje .....	41
5.1.3	Použité reagentie .....	42
5.2	Buněčné linie CT26 a MCF-7 .....	43
5.2.1	Kultivační médium .....	43
5.2.2	Pasážování buněk.....	43
5.2.3	Stanovení počtu životaschopných buněk .....	44
5.3	Tvorba 3D sféroidů .....	45
5.3.1	Příprava buněčné suspenze pro experimenty .....	45



5.3.2	Vytvoření sféroidů pomocí ULA destiček.....	46
5.4	Růst a uniformita sféroidů.....	46
5.5	Fototoxicita vybraných fotosenzitizérů.....	46
5.5.1	Xenonová výbojka jako zdroj záření .....	47
5.5.2	Hodnocení životaschopnosti sféroidů.....	48
5.6	Test invazivity.....	50
5.6.1	Test invazivity po PDT .....	50
5.7	Tkáňové řezy.....	51
5.8	Statistické zpracování dat.....	52
6	VÝSLEDKY.....	53
6.1	Stanovení počáteční koncentrace buněk pro tvorbu sféroidů .....	53
6.2	Sledování růstu sféroidů.....	56
6.3	Uniformita sféroidů.....	61
6.4	Vliv výměny média na růst sféroidů buněčné linie CT-26 v ULA destičce ....	61
6.5	Cytotoxicita.....	62
6.5.1	P40 .....	62
6.5.2	P44 .....	64
6.5.3	ZIP300 .....	66
6.5.4	PhotoSens® .....	68
6.6	Invazivita sféroidů.....	70
6.6.1	Invazivita CT-26 sféroidů po PDT .....	71
6.7	Tkáňové řezy CT-26 sféroidů .....	80
7	ZÁVĚRY .....	86
8	DISKUZE.....	87
9	SEZNAM ZKRATEK.....	94
10	POUŽITÁ LITERATURA .....	97

## 2 ÚVOD

U tématu „Vývoj 3D sférických buněčných modelů odvozených od buněčných linií lidského adenokarcinomu prsu MCF-7 a myšího karcinomu tlustého střeva CT-26“ mě nejvíce zaujal vývoj 3D sféroidů, a to z důvodu, že témata týkající se nádorových onemocnění jsou stále více aktuálnější. Nádorová onemocnění patří k těžko léčitelným onemocněním, proto se mnoho studií zabývá novými protinádorovými léčivými, terapeutickými přístupy a rezistencí nádorů k terapii.

Fotodynamická terapie (PDT) je léčebná metoda kombinující světelnou energii s fotosenzitizérem (PS) určená k zničení nádorových a prekancerózních buněk. PS se stává toxickým až po aktivaci světlem. Specifita PDT závisí na nádorové selektivitě PS, přesné aktivace světla a intracelulárním kyslíku. PS absorbuje fotony, generuje reaktivní formy kyslíku (ROS) v přítomnosti molekulárního kyslíku a vyvolává apoptózu nebo nekrózu. PS je minimálně toxický pro okolní tkáň a nenavozuje tak silné nežádoucí účinky, jako tomu je u konzervativních léčebných postupů, například chemoterapie. V dnešní době je k dispozici několik PS k léčbě různých onemocnění, nejen těch maligních, včetně akné, lupénky, několika druhů nádorů, jako jsou např. karcinomy kůže, plic, močového měchýře nebo nádory hlavy a krku. Významné postavení má PDT také u bakteriálních, plísňových a virových infekcí.

2D buněčné kultury jsou nejpoužívanější model *in vitro* pro zkoumání nádorového chování nebo účinnosti protinádorové terapie, zároveň mají mnohá omezení, jako je nedostatek mezibuněčných interakcí či interakcí s extracelulární matrix. 3D buněčné sféroidy mají k *in vivo* nádorům o něco blíže. Poskytují lepší poznatky při studiu buněčných interakcí zprostředkovaných signálními cestami a rozdílnou genovou expresí.

V teoretické části jsou zpracovány informace o 3D buněčných kulturách, zaměřené také na porovnání s 2D kulturami. Obsáhlá část je věnována technikám sloužících k tvorbě sféroidů. Další část práce je věnována principům PDT.

V praktické části jsme u dvou buněčných linií, CT-26 a MCF-7, vytvářeli sféroidy, pozorovali kinetiku jejich růstu, stanovovali fototoxicitu vybraných PSs, sledovali invazivní chování sféroidů a zjišťovali distribuci PS pomocí konfokální mikroskopie v tkáňových řezech.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Fotodynamická terapie (PDT)

Fotodynamická terapie (PDT) je moderní, minimálně invazivní léčebný postup, který může vyvolávat selektivní cytotoxickou aktivitu vůči maligním buňkám. PDT je založena na lokální nebo systémové aplikaci fotosensitizeru (PS), který se intenzivně hromadí v cílové tkáni. Molekuly PS pohlcují světlo příslušné vlnové délky a zahajují aktivační procesy vedoucí k selektivní destrukci nádorových, ale i jinak patologických buněk. V přítomnosti molekulárního kyslíku ( $^3\text{O}_2$ ) vede řada reakcí k přímé smrti nádorových buněk, poškození mikrovaskularity a indukci lokální zánětlivé reakce. Minimální toxicita vůči normálním tkáním, zanedbatelné systémové účinky, významné prodloužení života, nedostatek vnitřních nebo získaných mechanismů rezistence, činí z této léčby velmi cennou terapeutickou možnost. PDT se úspěšně používá v dermatologii, onkologii, gynekologii a urologii. PDT je využívána při léčbě chronických zánětů a jde tak o zajímavou alternativu při léčbě rezistentních bakteriálních infekcí (Agostinis et al., 2011; Kwiatkowski et al., 2018).

#### 3.1.1 Historie PDT

Terapie světlem je známa již po tisíce let. Ve starověkém Egyptě, Indii nebo Číně bylo světlo využíváno k léčbě kožních onemocnění, např. lupénky. Ve starověkém Řecku byli lidé vystavováni slunečnímu záření neboli helioterapii, u které bylo zjištěno, že má velmi dobré zdravotní účinky (Ackroyd et al., 2001).

Niels Finsen dále rozvíjel fototerapii na konci 19. století v Dánsku. Objevil, že vystavení se červenému světlu slouží nejen jako prevence, ale i léčba při vytváření puchýřků u pravých neštovic. Používal také ultrafialové světlo k léčbě kožní tuberkulózy. Za objev použití světelné terapie dostal Finsen v roce 1903 Nobelovu cenu (Dolmans et al., 2003).

Buněčnou smrt způsobenou interakcí světla s chemickými sloučeninami popsal v roce 1900 také německý student medicíny Oscar Raab pod vedením prof. von Tappeinera. Pracoval s akridinem, který se ukázal být po ozáření smrtelný pro

nálevníky (*Paramecium* sp.). Ve stejném roce francouzský neurolog J. Prime zjistil, že se u pacientů s epilepsií, kteří užívali orálně eosin, po expozici slunečním zářením vytvořila dermatitida. Tohoto poznatku využili H. von Tappeiner a A. Jesionek, kteří k léčbě kožních tumorů využili eosin a bílé světlo, a tak popsali fotodynamickou akci, která popisuje tento fenomén (Ackroyd et al., 2001; Dolmans et al., 2003).

V 60. letech 20. století Richard Lipson inicioval moderní éru PDT. Ve svých studiích využíval látku nazývanou hematoporfyrinový derivát (HpD), kterou vyvinul Samuel Schwartz. Mohl být podáván v mnohem menších dávkách než surový hematoporfyrin, což naznačovalo, že by mohl HpD sloužit jako slibný diagnostický nástroj (D. Kessel, 2004).

### 3.1.2 Mechanismus PDT

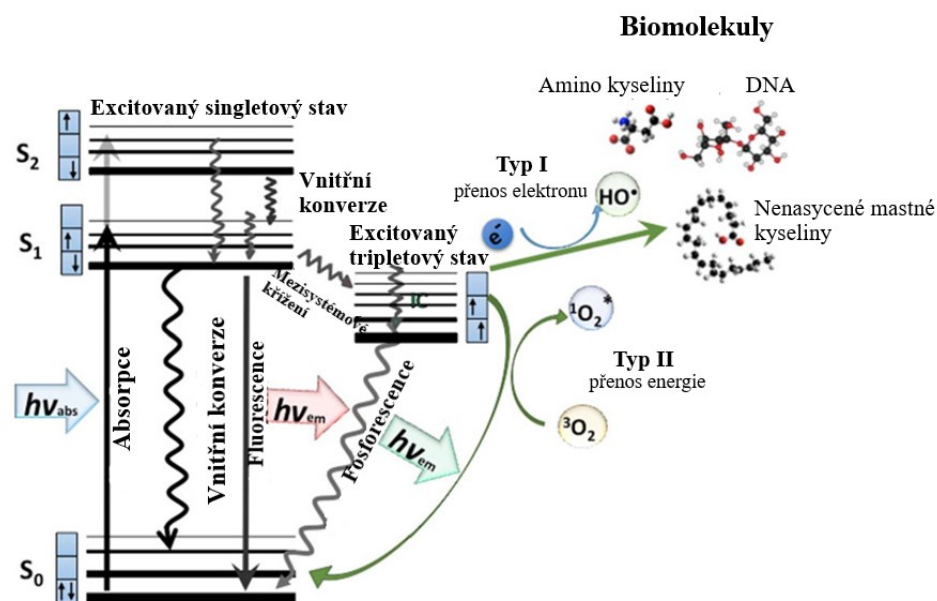
PDT je založena na třech netoxických složkách, které nejsou toxické a vyvolávají žádoucí účinky v patologické tkáni vzájemnou interakcí mezi světlem s danou vlnovou délkou, PS a  $^3\text{O}_2$ . (Kwiatkowski et al., 2018)

PS lze podat lokálně nebo systémově. Zářením se aktivuje PS a za přítomnosti  $^3\text{O}_2$  se spustí fotochemická reakce, která vede k tvorbě ROS. Dochází k nenávratnému poškození cév vyživujících nádor, který tak přichází o důležité živiny. Následuje smrt nádorových buněk apoptotickým, nekrotickým nebo autofagickým mechanismem, který aktivuje lokální zánět a rozvíjí imunitní odpověď (Dobson et al., 2018).

Pokud PS absorbuje světlo, dojde k přesunu jednoho elektronu na vyšší energetickou hladinu. Excitovaný PS je nestabilní a nadbytečnou energii vyzařuje ve formě tepla nebo fluorescence. V některých případech může excitovaný PS projít mezisystémovým přechodem a dostat se do stabilnějšího tripletového stavu (Agostinis et al., 2011).

V tripletovém stavu může PS přenášet elektron na sousední biomolekuly nebo přímo na  $^3\text{O}_2$ , což vede k tvorbě radikálů, které reagují s kyslíkem za vzniku ROS. Dochází tak k produkci superoxid anion radikálu ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hydroxylového radikálu ( $\cdot\text{OH}$ ) a peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Tyto produkty vznikají v reakci typu I. Alternativně, reakcí typu II může být energie excitovaného PS přenesena přímo na  $^3\text{O}_2$  a vytvoří se vysoce

reaktivní neradikálový singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ). Oba typy mechanismu PDT znázorňuje Obrázek 1 (Donohoe et al., 2019).



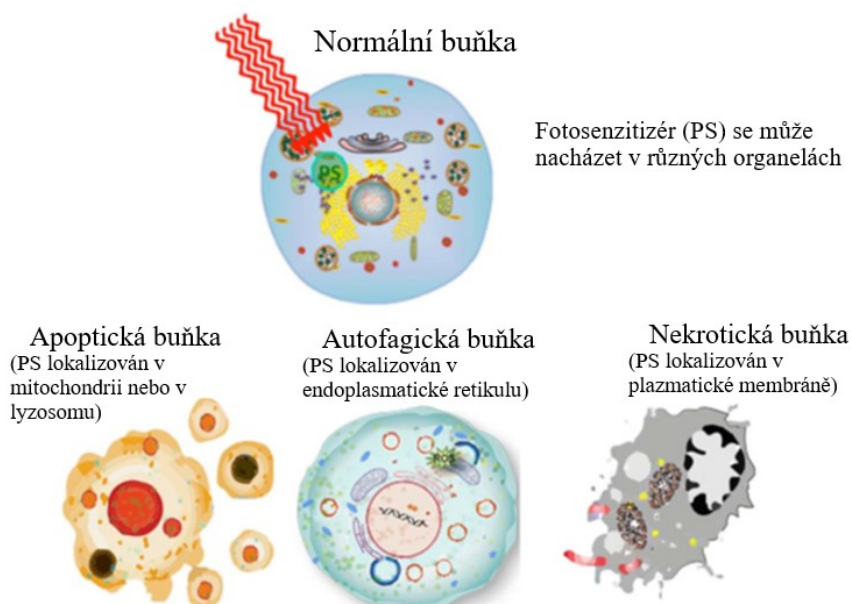
**Obrázek 1** Jablonského diagram. Když PS absorbuje světlo, přejde z nízkoenergetického do vysokoenergetického singletového stavu. Takto excitovaný stav může energii ztratit vydáním fotonu (fluorescence) nebo vnitřní konverzí. Proces známý jako mezisystémový přechod zahrnuje převrácení spinu vysokoenergetického elektronu, což vede k dlouhotrvající excitaci tripletového stavu. V nepřítomnosti molekulárního kyslíku ( $^3\text{O}_2$ ) se při reakci typu I tvoří superoxidové a hydroxylové radikály a při reakci typu II v přítomnosti  $^3\text{O}_2$  se vytváří singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ). Uvedené reaktivní formy kyslíku mohou způsobit poškození většiny typů biomolekul (aminokyseliny, lipidy, nukleové kyseliny). Upraveno z (Abrahamse & Hamblin, 2016).

Produkce  $^1\text{O}_2$  a  $\cdot\text{O}_2^-$  může ve výsledku způsobovat cytotoxicitu obou vzniklých produktů, které poté reagují a poškozují biomolekuly, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny.  $\cdot\text{O}_2^-$  vzniklé v reakci typu I mají relativně nízkou reaktivitu a toxicitu. Problém nastává, když se  $\cdot\text{O}_2^-$  zapojí do reakce, kde vzniká  $\text{H}_2\text{O}_2$ , který se poté účastní Fentonovy reakce za tvorby velmi reaktivního a nebezpečného  $\cdot\text{OH}$ . Např. reakce  $\cdot\text{HO}$  s mastnými kyselinami vede ke tvorbě radikálů, čímž se spustí řetězová reakce tzv. peroxidace lipidů a v důsledku dochází k poškození membrány. Předpokládá se, že většina PS působí prostřednictvím reakci typu II, kde je hlavní efektorovou molekulou  $^1\text{O}_2$ , způsobující oxidační poškození buněk. Výsledkem je tedy reakce  $^1\text{O}_2$  s membránovými lipidy (kde dochází k narušení buněčných membrán) nebo k reakci

s aminokyselinami, čímž se naruší funkčnost životně důležitých proteinů (Bacellar et al., 2015; Plaetzer et al., 2009; van Straten et al., 2017).

### 3.1.3 Dráhy buněčné smrti v PDT

Nerovnováha mezi vznikem ROS a schopností buňky dosáhnout detoxikace nebo opravit poškození, mohou vést k oxidačnímu stresu, který nakonec spustí různé mechanismy buněčné smrti. Studium těchto mechanismů se stále rozšiřuje a objevují se stále nové poznatky. Mezi nejznámější formy buněčného zániku patří nekróza, apoptóza a autofagie. Tyto tři hlavní mechanismy buněčné smrti jsou u PDT nejvíce studovány a ilustruje je Obrázek 2. Stejný PS může indukovat tři různé typy buněčné smrti v závislosti na podmínkách léčby. Pro vysoké PDT dávky je typická nekróza. Očekává se, že střední dávky PDT způsobí regulovanou buněčnou smrt (např. apoptózu). Autofagie bývá nejčastěji spouštěna u nízkých poškození a v závislosti na rozšíření poškození může následně aktivovat další mechanismy regulované buněčné smrti (Donohoe et al., 2019; David Kessel & Oleinick, 2018).



**Obrázek 2** Mechanismy buněčné smrti. Subcelulární lokalizace fotosenzitizérů v různých organelách (mitochondrie, lyzozomy, endoplasmatické retikulum, plazmatická membrána) hraje hlavní roli v typu buněčné smrti, který převládá. Svou roli hrají také další faktory, jako je například koncentrace PS. Upraveno z (Abrahamse & Hamblin, 2016).

### 3.1.3.1 Neregulovaná buněčná smrt – nekróza

Nekróza je rychlá a nekontrolovatelná forma buněčné smrti způsobená akutním, rozsáhlým, fyzikálním nebo chemickým poškozením. Tento proces vede k poruše iontových pump v plazmatické membráně. Je doprovázena zvýšenou propustností membrány, což má za následek příliv vody a iontů, buněčný otok, poškození cytoskeletu a kondenzaci chromatinu. Nekróza je považována za pasivní proces a nevyžaduje tak energii, syntézu bílkovin nebo regulaci signálních drah. Při rozpadu lyzozomů se uvolňuje velké množství lyzozomálních enzymů (především proteas) do cytoplasmy. Také je pozorována zvýšená hladina cytoplasmatického  $Ca^{2+}$ , který je zásadní pro aktivaci kalpainů a pro translokaci fosfolipasy A2 do buněčné membrány, aby mohlo dojít k jejímu narušení (Mroz et al., 2011).

Nekróza je také spojena s PSs, které mají tropismus k buněčné membráně a kdy po fotoaktivaci zprostředkovávají ztrátu integrity membrány a vyčerpávají ATP. Při krátké době inkubace se PS hromadí v plazmatických membránách, zatímco delší doba inkubace umožňuje akumulaci PS v intracelulárních organelách. To znamená, že preferenční cíl pro nekrózu je plazmatická membrána (Syntichaki & Tavernarakis, 2002).

### 3.1.3.2 Apoptóza

Apoptóza, tedy jedna z forem programované buněčné smrti, je složitý mechanismus sloužící k eliminaci nepotřebných nebo poškozených buněk. K zániku buňky dochází aktivací cysteinových proteas (kaspas) a následně jaderných endonukleas. Apoptóza se dělí na dvě hlavní cesty – vnitřní a vnější cestu. Během apoptózy (na rozdíl od nekrózy) nedochází k bobtnání, prasknutí a vylití obsahu buňky, které by způsobilo zánětlivou reakci (Fuchs & Steller, 2015).

Vnitřní cesta apoptózy je nejběžnější buněčnou smrtí u PDT. Jedná se o vysoce regulovanou cestu řízenou proteiny z rodiny Bcl-2. V buňce se vyskytují proapoptické (Bax, Bak) a protiapoptické (Bcl-2, Bcl-X) faktory, které jsou jinak v rovnováze. Při narušení této rovnováhy ve prospěch proapoptických faktorů nastává apoptóza. Vnitřní cesta apoptózy může být důsledkem přímého poškození mitochondrií (nebo poškození jiných buněčných struktur) a dochází tak k aktivaci signálních drah. Při porušení

homeostázy v mitochondriích se aktivují inhibiční proteiny (Bim, Bid), dojde k aktivaci proapoptických faktorů a k tvorbě pórů ve vnější mitochondriální membráně. Těmito póry uniká cytochrom c do cytosolu, kde se váže na APAF1 (apoptotic protease activating factor 1) a pro-kaspasu 9 za vzniku komplexu nazývaného apoptosom, který může spustit aktivaci kaspasy 9, jež následně proteolyticky aktivuje kaspasy 3 a 7. Takto aktivované efektorové kaspasy štěpí buněčné proteiny, které způsobují fragmentaci genomové DNA (Warren et al., 2019).

### **3.1.3.3 Autofagie**

Autofagie je dalším typem buněčné smrti nebo adaptivním mechanismem přežití buňky. Dochází zde k vytvoření charakteristického váčku s dvojitou membránou (autofagosom), který pohltí poškozený materiál a oddělí ho od cytoplazmy. Následně autofagosom splyne s lyzosomy a vznikne autolyzosom, kde je obsah degradován lyzosomálními hydrolasami. Tvorba autofagosomu je složitý a regulovaný proces zahrnující velké množství proteinů a signálních drah. Jestli bude autofagie mechanismem přežití nebo smrti závisí na stupni indukovaného fotopoškození. Po spuštění autofagie může zánik buňky nastat přímo autofagií nebo aktivací jiných mechanismů buněčné smrti (nejčastěji apoptózy). Ukazuje se, že smrt buněk autofagií vyvolanou PDT se vyskytuje především u buněk, kde je nedostatečná funkce apoptózy (Donohoe et al., 2019; D. Kessel, 2004).

### **3.1.4 Ochranné mechanismy nádorových buněk proti PDT**

V mnoha publikacích je uváděn ochranný mechanismus, který využívají nádorové buňky, aby se vyhnuly cytotoxickému účinku PDT. První mechanismus je spojen s expresí enzymů, které jsou schopné detoxikovat ROS. Přímý detoxikační enzym pro  $^1\text{O}_2$  neexistuje, jiné enzymy zapojené do dalších procesů ROS mohou ovlivnit cytotoxický efekt. Příkladem může být superoxiddismutasa (SOD), její nadměrná exprese může snižovat účinky PDT. Druhým obranným mechanismem je zvýšení hladiny antioxidantů v nádorových buňkách. Jak ve vodě rozpustné antioxidanty (např. glutation či vitamín C), tak i antioxidanty rozpustné v tucích (např. vitamín E) jsou přítomny v různých

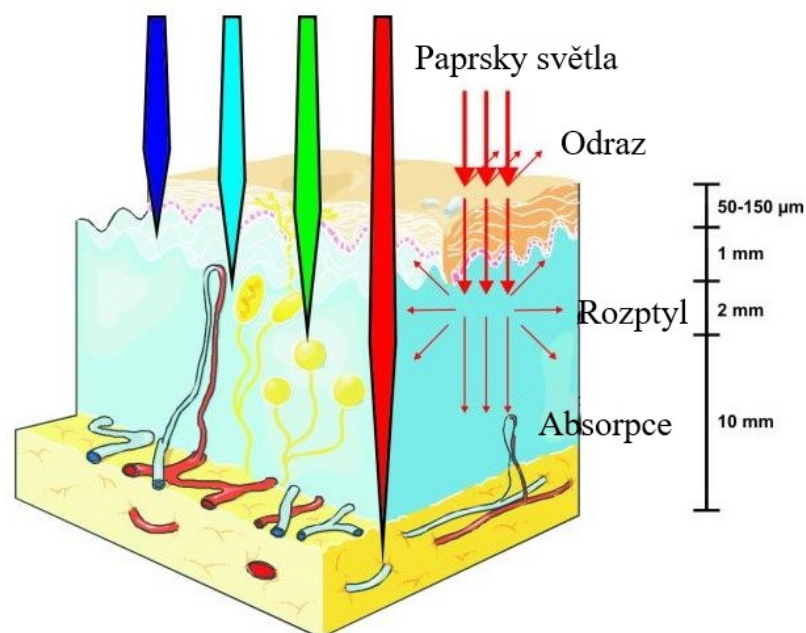


hladinách v mnoha typech nádorových tkání. Díky tomuto faktu může mít různá nádorová tkáň jinou citlivost vůči PDT. Třetí mechanismus zahrnuje proteiny, jejichž geny jsou indukovány PDT. Většinou se jedná o proteiny zasahující do signalizačních drah, které regulují apoptózu vyvolanou PDT, nebo se účastní oprav, které způsobil oxidační stres (Agostinis et al., 2011; Gołab et al., 2003).

### 3.1.5 Světelné zdroje v PDT

Světlo je nepostradatelná součást PDT. Oblast mezi 600 a 800 nm je vhodná pro PDT. Do této oblasti patří jak červené, tak blízké infračervené záření, přičemž oba typy pronikají nejhlouběji do tkání. Optické okno tkáně je od 600 od 1200 nm, ale pouze u vlnových délek do 800 nm dochází k efektivní tvorbě  $^1\text{O}_2$ , delší vlnové délky totiž nemají dostatečnou energii k zahájení PDT. (Castano et al., 2004)

V PDT jsou jako zdroje záření využívány výbojky nebo lasery, alternativou jsou světlo emitující diody (LED). Ideální světelný zdroj neexistuje. Výběr světelného zdroje závisí na více faktorech. Je důležité znát absorpční spektrum PS a typ onemocnění, kde se musí brát ohled na lokalizaci, druh tkáně, velikost léze a přístupnost. Pro PDT je také velmi důležité predikovat prostorové rozložení světla v cílové tkáni (Obrázek 3). Při vstupu světla do tkáně dochází buď k rozptylu, nebo absorpci světla samotnou tkání. Rozsah obou procesů závisí na typu tkáně a na vlnové délce světla. Je potřeba si uvědomit, že tkáně jsou nehomogenní. Při vícenásobném rozptylu v opakním prostředí dochází ke ztrátě směrovosti, tedy k rozptylu. Absorpce je způsobena přítomností tkáňových chromoforů (např. hemoglobin, myoglobin či cytochromy). Je tedy velmi důležité zvolit vhodnou kombinaci PS a světelného zdroje, která bude vhodná pro léčbu daného typu onemocnění nebo pro daný typ tkáně (Agostinis et al., 2011; Castano et al., 2004).



**Obrázek 3** Šíření světla v tkáních. Upraveno z (Agostinis et al., 2011).

### 3.1.6 Fotosenzitizéry

PS je jeden ze tří klíčových složek PDT. PSs jsou barviva schopná absorbovat světlo o specifické vlnové délce. Většina PSs používaných v klinické praxi je založena na tetrapyrrolovém jádře. PS by měl být v ideálním případě čistá sloučenina stabilní při pokojové teplotě. Silný absorpční vrchol by měl být v červené až infračervené oblasti (600-800 nm), protože, jak již bylo zmíněno, absorpce světla o vlnové délce vyšší než 800 nm neposkytuje dostatek energie k excitaci  $^3\text{O}_2$  do singletového stavu. Je vhodné, aby se absorpční pásy nepřekrývaly s absorpčními pásy látek obsažených v organismu, a také endogenními chromofory (hemoglobin, bilirubin apod.). PS by neměl vykazovat žádnou toxicitu bez ozáření a měl by být schopen relativně rychlého clearance z normálních tkání, čímž se dosahuje minimálních vedlejších účinků PDT. Interval mezi podáním PS a ozářením býval dříve dlouhý, což bylo považováno za žádoucí. Dnes se má za to, že odpověď nádorů na PDT může být podstatně lepší, když se tento interval zkrátí. PS je totiž stále přítomný v cévách a dochází tak k výraznému poškození cév zásobících nádor (Abrahamse & Hamblin, 2016).

Hematoporfyrin byl objeven na začátku 20. století a používal se jako první PS. Ve druhé polovině 20. století se čištěním a chemickou modifikací získal z hematoporfyrinu

HpD, který vykazoval lepší tkáňovou selektivitu pro nádory a menší fotosensitizační účinek na kůži. HpD se začal objevovat pod obchodním názvem Photofrin®, který se stal vůbec nejpoužívanějším PS. Přes široké využití v PDT má Photofrin® omezené klinické použití, a to kvůli jeho vlastnostem. Jedná se o směs o více než 60 molekulách, která má velmi nízkou chemickou čistotu. Kvůli maximální absorpci v oblasti kolem 408 a 510 nm a relativně nízké absorpci v oblasti kolem 630 nm (vhodnější pro PDT) jsou nutné delší ozařovací protokoly. Další nevýhodnou vlastností je vysoká akumulace v kůži. Tyto nedostatky PSs tzv. první generace bylo potřeba vyřešit a najít sloučeniny nové, které tyto nedostatky nemají, a řadíme je tak do druhé generace (Martinez De Pinillos Bayona et al., 2017).

Od 80. let 20. století se začalo s výzkumem nových potenciálních PSs. Ze stovek kandidátních látek se jen malé množství účastnilo klinických studií, a ještě menší počet se využívá v klinické praxi. Pro PSs druhé generace je charakteristická vyšší chemická čistota, vyšší tvorba  $^1\text{O}_2$  a hlavní absorpční pás v oblasti fototerapeutického okna tkáně. Tyto látky vykazují méně vedlejších účinků, a tím je i lepší selektivita pro nádorovou tkáň a rychlejší eliminace ze zdravých tkání. Nevýhodou těchto PSs bývá špatná rozpustnost ve vodě, což představuje omezující vlastnost pro intravenózní podání. Skupina PSs druhé generace zahrnuje syntetické porfyriny a proléčivo 5-aminolevulinovou kyselinu a její deriváty, deriváty benzoporfyrinu, texafyriny, deriváty thiopurinu, chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny (Kwiatkowski et al., 2018).

PDT má velký potenciál, ale k rozšíření v klinické praxi zatím v takové míře nedochází. Problém spočívá v nemožnosti podat některé PSs parenterálně. Cílem vývoje třetí generace PSs je zvýšit biologickou dostupnost PS a vyvíjet látky s vyšší afinitou k nádorové tkáni. Pro zvýšení selektivity dochází např. ke kombinaci PS s LDL lipoproteinem (nádorové buňky potřebují více cholesterolu pro syntézu buněčných stěn) nebo ke konjugaci PS s monoklonální protilátkou proti specifickému antigenu nádorové buňky (Dobson et al., 2018).

## 3.2 3D buněčné kultury

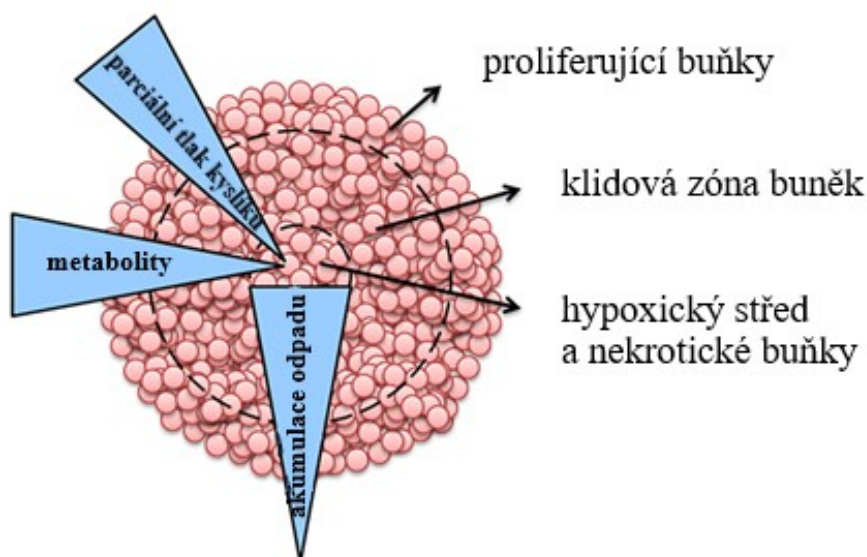
Buněčné kultury jsou velmi důležité pro testování léčiv a při zkoumání buněčné biologie a speciálních buněčných mechanismů. Nejpoužívanějšími modely jsou 2D buněčné kultury rostoucí v monovrstvách, které ale nenapodobují přirozené buněčné prostředí. Buňky jsou většinou zbaveny interakcemi mezi sebou a s extracelulární matrix (ECM). Mnohem lepším modelem *in vitro* jsou 3D buněčné kultury. Existuje několik metod, jak vytvořit 3D buněčné kultury: např. metoda visuté kapky, ULA destičky, metody založené na nosičích nebo mikrofluidní techniky, které se uplatňují v testování léčiv nebo modelování patologických stavů. Využití nacházejí také ve studiu nádorových onemocnění, a to jak pro testování nových protinádorových léčiv, tak pro lepší pochopení mechanismů těchto onemocnění. Výhodou je i možnost vytvářet kultury nádorových buněk s jinými buňkami, a tak lépe napodobit přirozené mikroprostředí, které se více podobá podmínkám *in vivo* (Białkowska et al., 2020).

### 3.2.1 3D kultury: svět mezi *in vitro* a *in vivo*

Vytváření 3D buněčných kultur znamenalo objev nového světa, kde se buňky postupně formují do těsných struktur ve svém prostředí. Díky tomu mohou buňky projevit svou fyziologickou strukturu v prostoru. Jedním z typů 3D kultur jsou sféroidy. Pro jejich formování jsou charakteristické tři zásadní kroky. V první fázi dochází k tvorbě volných agregátů. Ty jsou spojeny pevnou vazbou integrinů z buněčné membrány s dlouhými vlákny ECM, které obsahují řetězce se sekvencí RGD (Arg-Gly-Asp). Důsledkem této první agregace je zvýšená exprese kadherinu. Zadruhé, kadherin se začíná akumulovat na povrchu buněčné membrány. Nakonec vazby mezi jednotlivými kadheriny vytvářejí pevnější agregáty, což vede k tvorbě a růstu sféroidů (Foglietta et al., 2020).

Vytvořené sféroidy se skládají z několika vrstev, které lze rozdělit do tří zón, a to v závislosti na tom, jaká metoda byla k jejich vytvoření použita: a) proliferující okraj obsahující proliferativní buňky s aktivním metabolismem; b) klidová zóna, u které je typická minimální metabolická aktivita a dochází k jejímu zvětšování po kontaktu s živinami; c) nekrotická centrální zóna, kde jsou poškozená buněčná jádra a membrány.

K poškození jejich funkcí dochází kvůli nedostatku živin a hromadění toxického odpadu. V těchto třech vrstvách probíhá různá difúze molekul, kyslíku a živin, odstraňování metabolitů. Procesy probíhající ve sféroidech jsou schematicky znázorněny na Obrázku 4 (Foglietta et al., 2020).

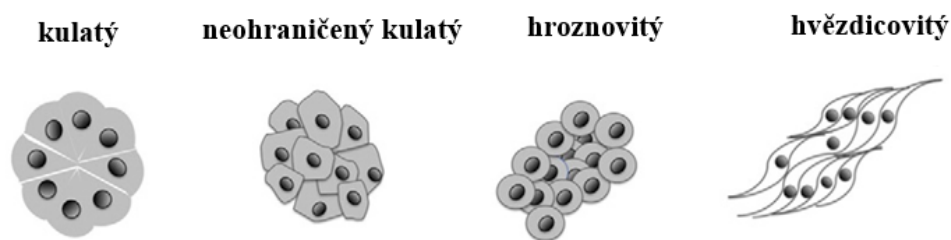


**Obrázek 4** Znázornění sféroidu a jeho fyzikálně-chemických procesů. Sféroid je možné rozdělit do tří zón: povrchová vrstva s proliferujícími buňkami, střední klidová zóna a hypoxické jádro s nekrotickými buňkami. V centrální části sféroidu je nízká úroveň kyslíku způsobující anaerobní respiraci, hromadění laktátu a  $\text{CO}_2$ . Parciální tlak kyslíku tedy klesá s rostoucí hloubkou. Upraveno z (Foglietta et al., 2020).

### 3.2.2 Struktura 3D sféroidů

Zatímco u 2D buněčných linií se tvoří pouze monovrstvy, u sféroidů pozorujeme rozličné struktury, které lze rozdělit do 4 skupin (Obrázek 5): kulaté (round), shluky (mass), hroznovité (grap-like) a hvězdicovité (stellate). Pro kulaté sféroidy je typické silné přilnutí mezi buňkami, jádra jsou pravidelně umístěna kolem středu kolonie. U těchto sféroidů dochází často k tvorbě tzv. tight junctions neboli *zonula occludens*. Kulaté neohraničené sféroidy (shluky) udržují nepravidelný přibližně kulatý tvar, zpravidla bývají větší než pravidelné kulaté sféroidy, adheze mezi buňkami je stále silná, jádra jsou ale dezorganizovaná. Sféroidy hroznovitého typu, jak napovídá název, mají tvar hroznů a vyznačují se slabou interakcí mezi buňkami. Protáhlé hvězdicovité sféroidy

jsou invazivní, schopné spojovat více kolonií nebo napadat ECM. Morfologie sféroidů se liší v závislosti na použité buněčné linii a na podmínkách kultivace (Nath & Devi, 2016).



**Obrázek 5** Morfologické struktury sféroidů, které závisí na povaze nádorové buňky a na podmínkách kultivace. Upraveno z (Nath & Devi, 2016).

### 3.2.3 Interakce tumoru s mikroprostředím u 3D buněčných kultur

V dnešní době je již známo, že na iniciaci, progresi a metastazování nádoru se podílejí i nenádorové buňky okolní tkáně a ukazuje se tak potřeba detailního studia nádorového mikroprostředí (TME; z angl. tumor microenvironment). Z dosavadních výzkumů vyplývá, že TME je dynamická, interaktivní a neustále se měnící specializovaná jednotka. TME zahrnuje různé buňky důležité nejen pro správnou homeostázu normální tkáně, ale také pro progresi nádoru, jeho migraci nebo rezistenci na léčbu. Pro zkoumání TME se zdají být vhodnější 3D buněčné modely, protože si oproti 2D kulturám zachovávají původní znaky podobné *in vivo* nádorům (původní tvar, genetický profil, heterogenitu nádorových buněk) (Hoarau-Véchet et al., 2018).

### 3.2.4 Proliferace

Jednou z hlavních vlastností nádorových buněk je jejich rychlý růst a ztráta kontaktní inhibice, která umožňuje normálním buňkám zastavit jejich proliferaci a růst, když jsou spolu ve vzájemném kontaktu. Buňky začnou tuto vlastnost ztrácet při jejich maligní transformaci, což vede k nekontrolovatelné proliferaci a tvorbě solidních nádorů (Ribatti, 2017).

Například Chen *et al.*, 2012 vytvářeli 3D modely buněk MCF-7 (buněčná linie nádoru prsu), pomocí kolagenového nosiče a zabývali se jak buněčnou morfológií,

tak i proliferací. V porovnání s 2D, kde měly buňky tvar trigonální až polygonální, se u 3D modelů tvořily kulaté buňky, které v kolagenové síti tvořily vícevrstvou strukturu. V prvních pěti dnech nebyl pozorován rozdíl v rychlosti růstu. Zatímco proliferace u buněk kultivovaných ve 2D se v 7. dnu snížila, u 3D modelů vytvořených za pomoci kolagenového nosiče přetrvala až do 13. dne (L. Chen et al., 2012).

Majety *et al.*, 2015 vyvinuli 3D modely kokultur buněk nádoru prsu, plic nebo prostaty s lidskými fibroblasty nebo fibroblasty asociovanými s nádorem (TAF; z angl. tumor-associated fibroblasts) v 96-jamkových destičkách potažených poly-2-hydroxyethylmethakrylátem. Zjistili, že společná kultivace s fibroblasty/TAF zvýšila proliferaci u nádorových buněk. Autoři také porovnávali životaschopnost monokultur nádorových buněk s kokulturami. Buněčné linie kultivované s fibroblasty vykazovaly zvýšené přežití oproti monokultuře. Také se ukázalo, že 3D kokultura s buňkami nádoru pankreatu vykazovala rozdílné přežití buněk v porovnání s 2D kokulturou (Majety et al., 2015).

Pro zkoumání desmoplastické reakce aktivované tzv. stroma-cancer crosstalk u duktuálního adenokarcinomu pankreatu (PDAC) zvolili Brancato *et al.*, 2017 k vytvoření 3D mikrotkáň *in vitro* míchací baňky s želatinovým mikronosičem. Lidská PDAC mikrotkáň byla získána kokultivací nádorových buněk pankreatu (PT45) s fibroblasty nebo s TAF. Z jejich analýz vyplývá, že fibroblasty kultivované společně s PT45 získaly fenotyp myofibroblastů a exprimovaly markery desmoplastické reakce. Ukázalo se, že takto vytvořená PDAC mikrotkáň hraje klíčovou roli v pochopení mikroprostředí a poskytuje nástroj k objasnění velmi komplexního vztahu stroma-nádor, což by v dalších výzkumech mohlo poskytnout testovací platformu pro protinádorová léčiva technologií mikročipů (tissue-on-chip). Běžnou vlastností 3D mikrotkáň je snížená míra proliferace v porovnání s 2D kulturami. U 3D modelů je pozorováno pomalejší tempo růstu, které se ale více podobá situaci *in vivo*, nejspíše jako důsledek omezené dostupnosti energie v rámci pevné struktury 3D struktur (Brancato et al., 2017).

V poslední době se hojně využívají mikrofluidní techniky. Například Chung *et al.*, 2017 použili k vytvoření 3D buněčných kultur mikrofluidní platformu na bázi hydrogelu. Kokultivací buněk adenokarcinomu vaječníků, kolorektálního karcinomu a karcinomu žaludku s lidskými plicními fibroblasty získali nový model pro zrekapitulování interakcí vyskytujících se mezi různými složkami TME během karcinogeneze. Tímto modelem byli schopni napodobit interakce mezi nádorovými a stromálními buňkami. Díky

mikrofluidní technice vyvolali současně angiogenezi a lymfogenezi, čímž ukázali, jak tyto mechanismy ovlivňují proliferaci nádorových buněk (Chung et al., 2017).

### 3.2.5 Migrace a invazivita

Migrace buněk je normální proces ve všech mnohobuněčných organismech. Je nezbytný pro normální vývoj a hraje důležitou roli v různých procesech, jako je hojení ran nebo imunitní reakce. Ve 2. polovině 20. století bylo popsáno chování buněk v blízkosti jiných buněk. Ukázalo se, že buňky v této situaci nejen že snižují rychlost, ale mění směr. Důležitý je pojem kontaktní inhibice lokomoce (CIL; z angl. contact inhibition of locomotion), kdy se buňka přednostně adheruje na substrát než na sousední buňky. Ztráta normální CIL u mnoha nádorových buněk je právě důvodem kontaktu s normálními buňkami. Toto migrační chování by mohlo podporovat invazivitu nádorových buněk, které by mohlo být posíleno interakcí se stromálními buňkami. Zajímavé je, že si nádorové buňky stále zachovávají CIL, i když narazí na jiné nádorové buňky. To znamená, že jejich selhání při expresi normální CIL při kontaktu s nemaligními buňkami by mohlo pocházet spíše z defektní signalizace než z obecného nedostatku mechanismů inhibice kontaktu. Tento jev hraje hlavní roli během procesu metastáz. Během maligní progresy získávají nádorové buňky schopnost napadat sousední tkáň a šířit se ve vzdálených orgánech prostřednictvím jevu zvaného přechod mezi epitelem a mezenchymem (EMT; z angl. epithelial-mesenchymal transition). Během EMT získávají nádorové buňky mezenchymální fenotyp, který jim umožňuje přechod přes bazální membránu a degradovat ECM metaloproteinasy, aby se dostaly do krevního řečiště (Dreymueller et al., 2017).

Většina studií a objevů o migraci buněk byla provedena na 2D modelech. Migrace ve 2D kulturách se řídí klasickými polarizovanými signálními a mechanickými vzory, které často nejsou zásadní pro efektivní migraci u 3D modelů. Existuje více režimů motility ve 3D, které jsou velmi složité a berou v úvahu nejen tuhost, ale také reologii a geometrii ECM (Friedl et al., 2012).

Ukazuje se, že buňky kultivované ve 2D nebo 3D často exprimují jiné povrchové proteiny. Loessner *et al.*, 2010 ukázali, že mRNA exprese buněčných povrchových receptorů,  $\alpha 3$ -,  $\alpha 5$ -,  $\beta 1$ -integrinů a proteasy MMP9 byly zvýšené v buňkách serózního



ovariálního cystadenokarcinomu ve 3D kultuře, vytvořené v PEG-hydrogelovém nosiči, ve srovnání s buňkami ve 2D. Chen *et al.*, 2015 použili mikrofluidní systém s PDMS vrstvou k vytvoření kokultury buněk karcinomu prsu s primárními TAF, kde po dobu 14 dnů sledovali tvorbu a růst sféroиду a prováděli transkriptomickou analýzu. Autoři prokázali, že nádor-stromální interakce indukovala změnu exprese genů asociovaných s proliferací, apoptotickou supresí, karcinogenezí a EMT v buňkách karcinomu prsu v kokultuře s primárními TAF. Autoři bohužel neporovnávali výsledky u 3D a 2D modelů (Y. C. Chen et al., 2015; Loessner et al., 2010).

3D kultivační systémy umožnily studium složitějších jevů, například schopnosti tvorby metastáz. Bersini *et al.*, 2014 vyvinuli 3D mikrofluidní model skládající se z tří kanálků pro média a čtyř samostatných kanálků s gelem, které byly potažené hydrobromid poly-D-lysinem. Do systému byl aplikován roztok kolagenu typu I s fosfátovým pufrém (PBS; z angl. phosphate buffered saline) a NaOH se zakotvenými osteo-diferencovanými mezenchymálními kmenovými buňkami odvozenými z kostní dřeně. Endotelové buňky byly zavedeny do kanálku za účelem vytvoření monovrstvy pokrývající rozhraní stěny kanálku a gelu. Nádorové buňky byly do kanálku zavedeny po třech dnech a přesídlení do oblasti podmíněné kostními buňkami bylo analyzováno po 24 hodinách. Systém trojkultur autorům umožnil studovat transendoteliální migraci vysoce metastazujících buněk karcinomu prsu a sledovat jejich chování v matrici podobné kostní tkáni. Extravazace byla významně vyšší v mikroprostředí podmíněném kostními buňkami ve srovnání s kolagenovou matricí. Migrační vzdálenost byla také výrazně vyšší. Proniknuté buňky proliferovaly a vytvořily mikrometastázy různých velikostí obsahující čtyři až šedesát buněk do 5. dne. Tato studie přináší nové poznatky a kvantitativní údaje o 3D *in vitro* extravazaci a tvorbě mikrometastáz buněk karcinomu prsu v mikroprostředí napodobující kostní tkáň a poukazuje jak na potencionální možnost využití mikrofluidní techniky pro lepší pochopení v nádorové biologii, tak i pro screening nových protinádorových léčiv (Bersini et al., 2014).

### 3.2.6 Odolnost vůči léčbě

Navzdory vývoji účinných cytotoxických léků proti mnoha typům nádorů se u nádorových buněk rozvíjí rezistence vůči lékům, jež je způsobena heterogenitou nádorů, inaktivací léků, vyhýbání se programované buněčné smrti, vylepšenou reparací DNA, zvýšeným odstraňováním léčiv a EMT. Po dlouhou dobu bylo selhání protinádorové léčby přisuzováno pouze genetice nádorových buněk a buněčným procesům vyskytujících se v nádorových buňkách. V posledních desetiletích se však pozornost přesunula k roli TME ve vývoji chemorezistence. Různorodost uvnitř TME (zahrnující stromální buňky, ECM, dostupnost kyslíku a pH prostředí) se tak stala důležitým vodítkem v odpovědi na protinádorovou léčbu. Komunikace mezi nádorovými buňkami a TME je obousměrná a mnohem složitější, než se myslelo. Nádorové i stromální buňky jsou v průběhu léčby vystaveny různým koncentracím léků a rozvíjejí kooperativní vztah, který prospívá nádorovým buňkám. Ve 2D jsou všechny buňky vystaveny stejné koncentraci léčiva, množství kyslíku nebo pH prostředí. Mezibuněčná komunikace je navíc limitována na prostorové a fyzikální aspekty 2D kultur. U 3D modelů je architektura složitější, sféroidy jsou uspořádány do tří vrstev, které jsou popsány výše. Hladina kyslíku a živin je v jádru v důsledku omezené difúze nižší, a to v důsledku buněčné hustoty a přibývání ECM, což reflektuje podmínky vyskytující se v *in vivo* solidních nádorech. Konstantní hypoxie v jádře vede ke glykolýze a syntéze CO<sub>2</sub>, pyruvátu a laktátu a z toho vyplývající acidifikace prostředí. Buňky se musejí přizpůsobit tomuto nepříznivému prostředí, aby mohly růst. Proto jsou některé cytotoxické látky, jako je doxorubicin, 5-fluoruracil nebo cisplatina, pracující s kyslíkem méně účinné u 3D modelů. Zatímco jiná léčiva, například tirapazamin, která jsou více účinná v hypoxických buňkách, vykazují u sféroidů s hypoxickým jádrem větší účinnost (Senthebane et al., 2017).

Chen *et al.*, 2016 použili mikrofluidní platformu pro studium rezistence protinádorových léčiv navozenou TAF u buněk karcinomu prsu. Pro studium lékové rezistence používali buněčnou linii T47D (buňky karcinomu prsu) kultivovanou v médiu podmíněném fibroblasty a v normálním médiu. Jako chemoterapeutikum byla použita cisplatina. Výsledky potvrdily lékovou rezistenci indukovanou fibroblasty. Huber *et al.*, 2016 kultivovali nemalobuněčný karcinom plic Colo699 v monovrstvě (2D) v destičce po dobu 5 dní a mikrotkáň (3D) vytvořili metodou visuté kapky po dobu 5 a 10 dní. Buňky

a mikrotkáň byly ovlivňovány různými léčivými: afatinibem, cisplatinou a vinorelbinem po dobu 24 nebo 48 hodin. Autoři ukázali významný rozdíl v účinnosti léčiv u 2D a 3D. 3D kultury sice vykazovaly rezistenci vůči cisplatině a vinorelbinu, ale byly citlivé na afatinib, což dokazuje, že 3D model byl bližší *in vivo* systému v porovnání s 2D kulturami (Y. C. Chen et al., 2016; Huber et al., 2016).

### 3.2.7 Využití 3D kultur

#### 3.2.7.1 Sféroidy kmenových buněk pro regenerativní medicínu

Kmenové buňky jsou hojně využívány jako buněčný zdroj pro aplikaci v regenerativní medicíně a v buněčné terapii. Tradiční 2D techniky v kombinaci se současnými praktikami mohou být neúčinné pro rozšíření kmenových buněk pro klinickou praxi. To odráží i fakt, že 2D kultury nejsou schopny reprodukovat *in vivo* mikroprostředí kmenových buněk. Při 2D kultivaci se často snižují replikační a diferenciační schopnosti mezenchymálních kmenových buněk (MSC). Naproti tomu MSC kultivované jako sféroidy vykazují významně rozdílnou morfologii od 2D kultur. Kromě toho, ve srovnání s 2D kulturami, mají MSC sféroidy různé vzorce genové exprese, s up-regulací mnoho genů asociovanými s hypoxií, angiogenezí, zánětem a stresovou reakcí (Cesarz & Tamama, 2016; Tsai et al., 2015).

Uvádí se, že kultury sféroidů zlepšují terapeutické účinky založené na MSC. Bylo zjištěno, že oproti 2D kulturám, MSC sféroidy poskytují několik dalších prospěšných účinků, jako je zlepšení protizánětlivých, regenerativních a reparativních účinků tkáně, ale i lepší postransplantační přežití MSC. Navíc MSC sféroidy odvozené z lidské tukové tkáně produkovaly vyšší hladiny ECM proteinů, vykazovaly silnější antiapoptické a antioxidantní schopnosti a zvýšily parakrinní sekreci cytokinů. Xu *et al.*, 2016 při aplikaci MSC modelovým potkanům s ischemicko-reperfúzním poškozením navozeným akutním poraněním ledvin, zjistili, že tyto MSC sféroidy byly účinnější při ochraně ledvin před apoptózou, snižování poškozené tkáně, podpoře vaskularizace a zlepšení renálních funkcí v porovnání s 2D buněčnými kulturami (Xu et al., 2016).

Kultury sféroidů byly použity k obohacení pro pacienta specifických kmenových buněk k léčbě onemocnění. Například Henry *et al.*, 2015 aplikovali sféroidy k dospělým

plicním kmenovým buňkám pro použití k léčbě idiopatické pulmonární fibrózy u myši. V suspenzní kultuře výrůstky buněk ze zdravých explantátů plicní tkáně, samy sebe agregovaly do sféroidů a získaly fenotyp zralé epitelové tkáně. Myši, které obdržely tyto sféroidy, vykazovaly pokles zánětu a fibrózy (Henry et al., 2015).

Sféroidy byly také použity ke zvyšování produktů kmenových buněk pro použití v klinických studiích. Například výrobní proces endodermových pankreatických buněk (PEC-01) zahrnuje dynamickou suspenzi sféroidní kultury. PEC-01 je odvozena z CyT-49 lidských embryonálních kmenových buněk a je buněčnou složkou kombinovaného produktu VC-01 z ViaCytes pro léčbu diabetu 1. typu. PEC-01 po transplantaci dozrává a reguluje hladinu glukózy v krvi (Schulz, 2015).

### **3.2.7.2 Organoidy pro transplantaci**

Výzkum organoidů postupuje velice rychle, a proto by mohly organoidy poskytnout zdroj autologní tkáně pro transplantace. Například renální organoidy odvozené od pluripotentních kmenových buněk byly úspěšně transplantovány v renálních kapsulích dospělým myším. Taguchi *et al.*, 2014 zrekonstruovali 3D strukturu ledvin *in vivo*, zahrnující glomeruly s podocyty a renální tubuly s proximálními a distálními kanálky. Kromě toho byly glomeruly účinně vaskularizovány po transplantaci, což je slibný krok ve strategii transplantace ledvin (Fang & Eglen, 2017; Taguchi et al., 2014).

I když jsou organoidy na začátku vývoje, náhrada na bázi organoidů by mohla najít aplikaci u dalších onemocnění, jako jsou organoidy sítnice získané z lidských ESC pro léčbu určitých typů degenerace a slepoty sítnice, střevní organoidy pro výměnu tlustého střeva po úrazu nebo po odstranění nemocné tkáně a genově vhodné organoidy pro nahrazení poškozených orgánů s genovým poškozením. Například střevní organoidy získané z Lgr5<sup>+</sup> dospělých buněk tlustého střeva byly transplantovány do povrchově poškozeného tlustého střeva myši. Výsledky ukázaly, že transplantované dárcovské buňky byly snadno integrovány do tlustého střeva myši a pokrývaly oblast, kde chyběl epitel, jako důsledek způsobeného poškození u myších příjemců. Po rozsáhlé *in vitro* expanzi bylo pozorováno dlouhodobé dělení transplantovaných organoidů odvozených z jedné kmenové buňky tlustého střeva Lgr5<sup>+</sup>. Tato studie ukazuje proveditelnost léčby

kmenovými buňkami tlustého střeva na základě expanze *in vitro* jedné dospělé kmenové buňky tlustého střeva (Yui et al., 2012).

### 3.2.7.3 Modely pro neurodegenerativní onemocnění

3D buněčné kultury jsou hojně používány v lékařských studiích, například při výzkumu neurodegenerativních onemocněních. Jedná se o skupinu vrozených či získaných poruch nervového systému, charakterizovaných postupnou degenerací nervových buněk, vedoucích k jejich smrti. Neurony vykazují patologické změny vedoucí k tvorbě agregátů modifikovaných proteinů, které jsou neurotoxické a odolné vůči proteolytickým enzymům. Mezi tyto abnormální proteiny patří  $\beta$ -amyloid u Alzheimerovy choroby,  $\alpha$ -synuklein u Parkinsonovy choroby a protein huntigtin u Huntingtonovy choroby. Tyto proteiny narušují funkce neuronů, a nakonec vedou k nekróze nebo apoptóze (Białkowska et al., 2020).

Nové pokroky v kultivaci 3D buněčných kultur umožnily generovat nové modely sféroidů nervových buněk, které rekapituluji patologické stavy Alzheimerovy choroby, včetně robustních depozit  $\beta$ -amyloidu. Tyto nové modely slibují novou platformu, kterou lze použít pro studium mechanismů v prostředí podobném lidskému mozku a pro vysoce výkonný screening léků, jak uvádí Choi *et al.*, 2016. Charakteristickými rysy buněk jsou aktivity dopamin- $\beta$ -hydroxylasy a tyrozinhydroxylasy, uvolňování určitého množství noradrenalinu a přítomnost cholinacetyltrasferasy, acetylcholinesterasy a butylcholinesterasy. Seidel *et al.*, 2012 použili sféroidy buněčné linie lidského neuroblastomu (SH-SY5Y), který nadměrně exprimuje fúzní protein (EGFP s  $\tau$ -proteinem) jako model pro studium patologií  $\tau$ -proteinu u Alzheimerovy choroby. Získali 3 varianty SH-SY5Y nadměrně exprimující tau (0N4R). Ke zvýšení tautopatie byla použita varianta K280q (čtyřnásobná genová mutace v  $\tau$ -proteinu) (Choi et al., 2016; Seidel et al., 2012).

Charakteristickým znakem Parkinsonovy choroby je progresivní ztráta dopaminergních neuronů. Bolognin *et al.*, 2019 odvodili lidské neuroepiteliální buňky z indukovaných pluripotentních kmenových buněk a úspěšně je diferencovali na dopaminergní neurony pomocí mikrofluidních bioreaktorů. Po třicetidenní diferenciaci v mikrofluidních bioreaktorech, potvrdili přítomnost dopaminergních neuronů, které byly

spontánně elektrofyzilogicky aktivní, což je charakteristické pro nigrostriální dopaminergní neurony *in vivo*. Diferenciace byla stejně účinná jako v makroskopické kultuře, až 19 % diferencovaných neuronů bylo imunoreaktivních na tyrosinhydroxylázu (předposlední enzym v syntéze dopaminu). Tento nový mikrofluidní model buněčné kultury začleňuje nejnovější inovace ve vývoji biologie a v mikrofluidní buněčné kultuře, za účelem vytvoření biologicky realistické a ekonomicky efektivní cesty k personalizovanému designu léků na Parkinsonovu chorobu (Bolognin et al., 2019).

#### **3.2.7.4 Sféroidy hepatocytů jako model pro studium jaterních funkcí a nemocí**

Systém sféroidů primárních lidských hepatocytů (PHH) je slibným nástrojem pro zkoumání jaterních onemocnění a funkcí, dlouhodobého poškození jater vyvolaného léky a testování léků, protože 2D kultury se zdají být nepoužitelné. Kultivace PHH za chemicky specifických podmínek vytváří sféroidy podobné játrům *in vivo*. Je možné pozorovat morfologii, životaschopnost a některé funkce specifické pro hepatocyty minimálně 5 týdnů po kultivaci a zůstávají fenotypicky stabilní. Buňky PHH by se mohly společně kokultivovat s neparenchymálními buňkami, např.: Kupfferovými buňkami, žlučovými nebo stelárními buňkami, což podporuje jejich dlouhodobou životaschopnost. Bell *et al.*, 2016 provedli proteomickou analýzu buněk PHH kultivovaných jako sféroidy (sedmidenní sféroidy) a jako 2D kultury (po 24 hodinách a 7 dnech) s játry, ze kterých buňky pocházejí. Rychlé změny byly pozorovány ve 2D kulturách. Měření po 24 hodinách ukázalo, že exprese 457 proteinů byla změněna. Po 7 dnech byly rozdíly v expresi vidět u 358 proteinů, kde exprese 282 z nich byla změněna i po 24 hodinách. Po měření sféroidů bylo pozorováno, že méně proteinů vykazovalo změnu v expresi. Navíc u sféroidů si buňky zachovaly interindividuální rozdíly, to bylo ověřeno ve srovnání s odpovídajícími jaterními kousky, z nichž byly získány. Analýza sekrece albuminu ukázala, že funkce specifické pro hepatocyty v PHH sféroidu byly stále při dlouhodobé kultivaci a sekrece byla stabilní. PHH sféroidy se zdají být vhodným modelem pro testování jaterních patologií. Vystavení sféroidů chlorpromazinu vedlo k významné akumulaci žlučových kyselin, což naznačovalo poruchy transportu žlučových kyselin charakteristické pro cholestázu. Léčba PHH sféroidů cyklosporinem A navíc způsobila zvýšení množství neutrálních lipidů, které jsou spojeny se steatózou.

To naznačuje, že by PHH sféroid mohl vytvořit model pro steatózu *in vitro*. Tento model je také vhodný pro studium základních mechanismů tohoto onemocnění a pro screening léků (Bell et al., 2016).

### 3.2.7.5 Aplikace 3D kultur v designu léčiv

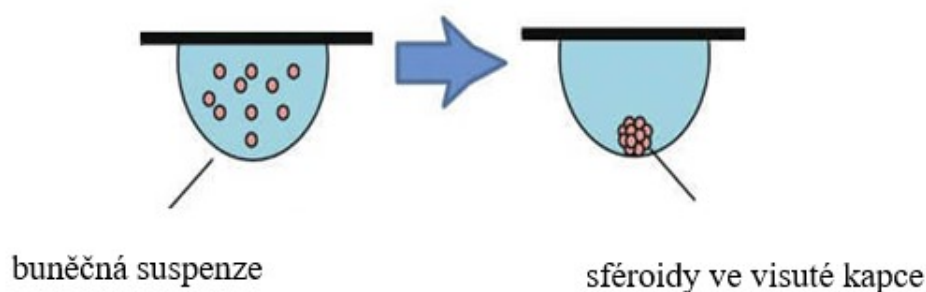
V posledních letech se v objevování nových léčiv stávají více využívány 3D buněčné kultury, které lépe modelují mikroprostředí *in vivo*, a proto se očekává, že přinesou výsledky s vyšší prediktivní hodnotou pro klinický výzkum. Kromě toho, autentické modely 3D buněčné kultury používající lidské buňky mohou obejít nevýhody myších modelů, které kromě vysokých nákladů a etických úvah, nejsou vždy schopny přesně rekapitulovat lidské nemoci nebo zachytit vedlejší účinky léku, jako je jaterní toxicita. Za účelem zlepšení procesu objevování léčiv, podpory při vývoji nových farmakologických přístupů nebo k použití při zkouškách toxicity *in vitro*, bude nutné brát v úvahu u 3D modelů buněčných kultur, že reakce na široké spektrum léčiv se liší podle konkrétní buněčné linie nebo typu nádoru. Odpověď na terapeutické sloučeniny se může pohybovat od rezistence na léčivo až po zvýšenou citlivost založenou na tkáňově specifickém složení ECM, interakci se stromálními buňkami a přítomnosti imunomodulačních molekul. Ve výzkumu nových technologií 3D kultur zbývá ještě mnoho práce na vývoji systémů, které přesně představují podmínky *in vivo* a patologii onemocnění. Současně, 3D buněčné kultury otevírají dveře k modelování prostředí buněčných kultur, aby podporovaly požadované chování buněk. Modely zaměřené na zvýšenou buněčnou motilitu, indukci reverzibilní zástavy buněčného cyklu, podporu diferenciací v epitelových buňkách a neuronech, podporu vlastností podobných kmenovým buňkám nebo požadovaného mikroprostředí, jako metastázy, umožňují konkrétněji zacílit určité buněčné chování při objevování léčiv. Navíc, objev protinádorových léků kombinující technologii 3D buněčných kultur s nádorovými buňkami odvozenými od pacienta a data molekulárního profilování nebo tvorba 3D organoidních bank nádorových buněk, které jsou reprezentativní pro podtypy molekulárních nádorů, mohou být do budoucna vhodné pro preklinický personalizovaný screening kandidátů pro zlepšení výsledku léčby a snížení vedlejších účinků léčby (Langhans, 2018).

### 3.2.8 Tvorba 3D modelů

Moderní vývoj techniky a bioinženýrství umožnil rozvoj velkého množství postupů pro tvorbu 3D buněčných kultur. Pomocí různých systémů lze vytvořit mnohobuněčné sféroidy a organoidy, které mohou být vytvořeny s pomocí nosiče nebo bez něho. Technicky náročnější je tvorba tzv. organ-on-chip a 3D biotisk. Ačkoli má každá 3D kultura jinou metodiku, všechny jsou využívány k navození mikroprostředí, morfologických a funkčních znaků lidských tkání a orgánů (Nath & Devi, 2016).

#### 3.2.8.1 Metoda visuté kapky

Tato technika není nijak složitá a nepotřebuje speciální materiální vybavení. Visuté kapky lze vytvářet v kultivačních destičkách nebo v Petriho misce. Buněčná suspenze je nanášena po kapkách na spodní stranu kultivační destičky a převrácením se buňky začnou spontánně agregovat ve špičce kapky. V kapce se produkuje jeden sféroid (Obrázek 6), který může obsahovat různé buněčné linie. Ukázalo se, že výhodou této metody je tvorba sféroidů o stejné velikosti, a to v monokulturách i kokulturách, čehož lze dosáhnout i z malého počtu buněk. To může být významné u některých vzácných typů buněk. Náročná je tato metoda však na udržení životaschopnosti sféroidů, protože kapky jsou vytvářeny z malých pracovních objemů, a proto je důležité často vyměňovat médium, aby nedošlo k dehydrataci a k deprivaci živin (Foglietta et al., 2020).

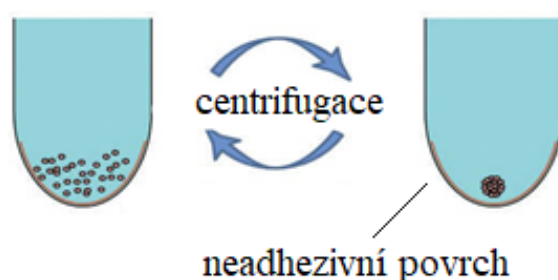


**Obrázek 6** Visutá kapka, upraveno z (Breslin & O'Driscoll, 2013).



### 3.2.8.2 Destičky s velmi nízkou adhesivitou (ULA)

Destičky jsou ošetřeny specifickým povrchem (agar nebo poly-2-hydroxyethylmethakralát), který vytvoří vrstvu neumožňující adhezi buněk na plastový povrch jamky (Obrázek 7). To donutí buňky tvořit agregáty a formovat se do sféroidu. Na trhu jsou komerčně dostupné ULA destičky od několika výrobců, které jsou sice dražší, ale odpadá časově náročná práce s vlastnoručním potahováním destičky (Breslin & O'Driscoll, 2013).



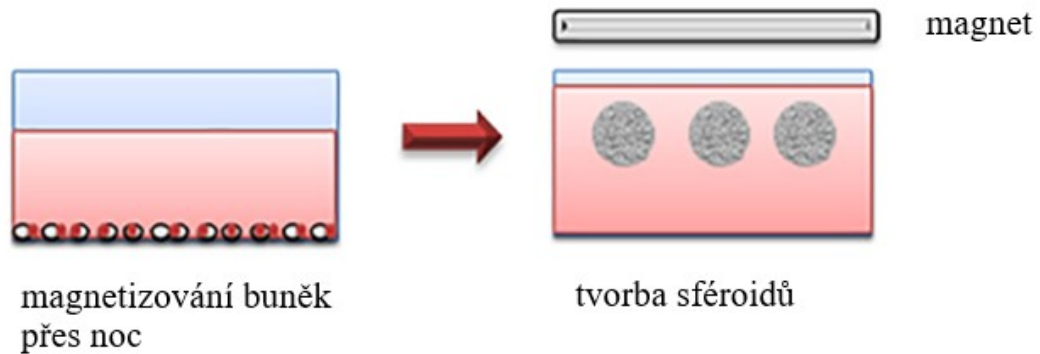
Obrázek 7 ULA destička, upraveno z (Breslin & O'Driscoll, 2013).

### 3.2.8.3 Magnetická levitace

Vytvoření sféroidů spočívá v kombinaci buněk s magnetickými nanočásticemi. Takto ošetřené buňky jsou umístěny do mikrotitračních destiček, kde na horní části destičky je umístěn magnet. Během několika hodin se začínají tvořit sféroidy (Obrázek 8) (Foglietta et al., 2020).

Mezi výhody této metody patří rychlý růst sféroidů, velikost v rozmezí  $\text{mm}^3$  a možnost využívat nespecifické médium. Zajímavé jsou výsledky od Jaganathan *et al.* 2014, kteří testovali účinky široce používaného protinádorového léčiva, doxorubicinu, na 3D buněčných modelech rakoviny prsu a fibroblastech vytvořených pomocí magnetické levitace. V kokultuře buněk karcinomu prsu a fibroblastů bylo pozorováno zmenšení o 80 % sféroidní plochy a hustota sféroidů klesla o 45 %. Pokles plochy a hustoty sféroidů souhlasily s výsledky *in vivo* při léčbě doxorubicinem se stejnou koncentrací (Jaganathan et al., 2014).

Na první pohled je to vhodná metoda pro tvorbu sféroidů, která ale není cenově příznivá, kvůli drahým magnetickým částicím. Ve vysokých koncentracích mohou být částice pro buňky toxické a nemusí být dostatečný počet buněk pro tvorbu sféroidů o požadované velikosti (Hoarau-Véchet et al., 2018).



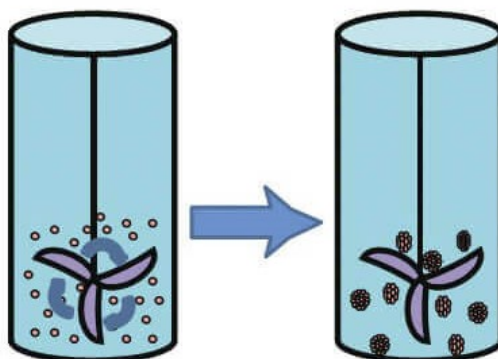
**Obrázek 8** Magnetická levitace. Upraveno z (Foglietta et al., 2020).

#### 3.2.8.4 Metody založené na agitaci

Tvorbu sféroidů založenou na agitaci lze rozdělit do dvou kategorií – míchací baňky a rotující bioreaktory. Základní princip u obou metod spočívá v uložení buněčné suspenze do kontejneru a suspenze je udržována v pohybu, buď jemným mícháním, nebo rotací nádoby. Nepřetržitý pohyb buněčné suspenze neumožňuje přilnutí buněk na stěnu bioreaktoru a podporuje interakce mezi buňkami (Gupta et al., 2016).

#### 3.2.8.4.1 *Spinner flask bioreactor (míchací baňky)*

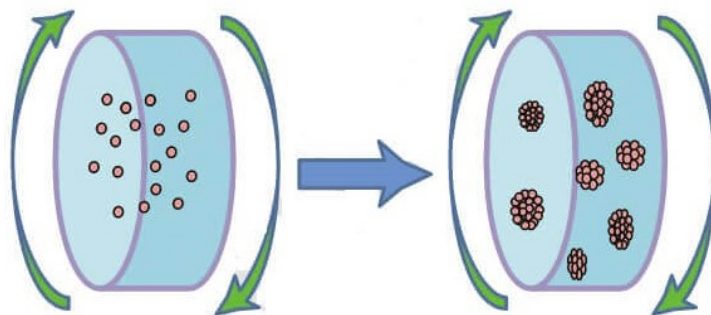
Pro míchací baňky je typické magnetické míchadlo ve středu bioreaktoru zajišťující kontinuální pohyb buněčné suspenze (Obrázek 9). Produkce různých velikostí sféroidů závisí na velikosti kontejneru. Stále se pohybující médium poskytuje buňkám stálý přísun živin a kyslíku, ale i odstranění odpadních produktů. Snadná výměna média zaručuje dlouhodobou kultivaci. Nicméně, smykové síly míchadla mohou změnit fyziologii buněk. V porovnání s destičkovými metodami se pohybuje spotřeba média mezi 100-300 ml (záleží na velikosti kontejneru). Mezi nedostatky metody také patří i nekonzistentnost velikosti sféroidů (Breslin & O'Driscoll, 2013; Gupta et al., 2016).



**Obrázek 9** Míchací baňka. Převzato z (Breslin & O'Driscoll, 2013).

#### 3.2.8.4.2 *Rotating cell culture bioreactor (rotující bioreaktor)*

Mechanismus rotujícího bioreaktoru je podobný jako u míchací baňky, ale místo míchadla se používá pro udržení plynulého pohybu kontejner, který celý rotuje (Obrázek 10). Na začátku, když jsou ještě buňky jednotlivě v suspenzi, rotuje kultivační komora při nízkých otáčkách. Jakmile se začnou tvořit sféroidy, rychlost otáček narůstá, a tím se udržují sféroidy v suspenzi. Menší ovlivnění fyziologie buněk je způsobenou nízkou smykovou silou. Přestože je systém jednoduchý, snadný na ovládání a vhodný pro dlouhodobou kultivaci sféroidů, nevýhodou je opět velká rozdílnost ve velikosti sféroidů (Fang & Eglén, 2017).

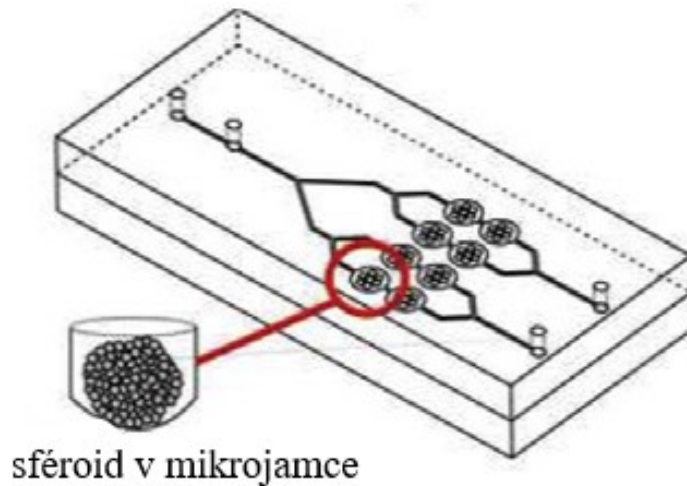


**Obrázek 10** Rotující bioreaktor. Převzato z (Breslin & O’Driscoll, 2013).

### 3.2.8.5 Mikrofluidní systém

Mikrofluidní techniky se začaly rozvíjet v 90. letech 20. století a umožnily vytvořit systémy pro různé biologické aplikace. Představují skvělou platformu pro navození komplexního a dynamického mikroprostředí u 3D buněčných kultur, které je snadno ovladatelné, reprodukovatelné a optimalizovatelné. Metody známé třeba jako Lab-on-chip jsou používány k vývoji a testování léčiv, studiu lékové rezistence, pro genetickou analýzu, tkáňové inženýrství, kmenové buňky nebo k detekci patogenů. Pro 3D buněčné kultury má mikrofluidní systém několik výhod. V mikroskopickém měřítku je schopen napodobit systém *in vivo*. Lze vytvářet chemický gradient, který napodobuje složitou a dynamickou 3D síť přítomnou v reálném systému. Polydimethylsiloxan a další substráty používané v mikrofluidních systémech jsou propustné pro kyslík, nezbytný pro buněčný růst a proliferaci. Mikrofluidika představuje mnohostrannou technologii, která je schopná obstarat více kroků, jako je kultivace buněk, doplňování média, odstraňování odpadních látek, dávkování léčiv i vlastní detekci na jednom zařízení. Mikrofluidní technologie jsou cenově dostupné, a to i díky spotřebě malého množství vzorků i média (dávkování v nanolitrech). Navození mikroprostředí podobného jako je *in vivo* v mikrofluidním systému, by mělo být schopné vytvářet ideální podmínky pro 3D systém buněčných kultur. Pro tvorbu 3D kultur se používají různé mikrofluidní systémy podle použitého substrátu, které se dělí na platformy na bázi skla/křemíku, polymeru nebo papíru (Obrázek 11). Výroba se obvykle provádí fotolitografickými technikami (Barata et al., 2016; Duval et al., 2017).

## sféroid na mikročipu



**Obrázek 11** Mikrofluidní systém. Upraveno ze (Zuchowska et al., 2017).

### 3.2.8.6 Techniky založené na ukotvení

Laminin, kolagen, alginát a další materiály jsou využívány pro vytvoření základní konstrukce sloužící k tvorbě 3D buněčných kultur. Techniky jsou založené na nosičích (scaffold), které vytváří vláknité sítě umožňující buňkám snadno migrovat a interagovat mezi sebou. Postupným růstem buněk se vyplňuje prostor mezi vlákny a tvoří se 3D struktura. Důležité je, aby materiál, z kterého je nosič vyroben, umožnil dostatečný přísun živin a kyslíku nezbytných pro přežití buněk, ale také aby docházelo k odstraňování odpadních produktů. Materiálů pro výrobu nosičů je velké množství, nabízejí však různou variabilitu, jak napodobit mikroprostředí daných tkání. Lišit se mohou v pórovitosti, propustnosti, chemických a mechanických vlastnostech. Podle zdroje, z kterého se jednotlivé nosiče vyrábí, je rozdělujeme do dvou tříd, přírodní a syntetické (Fang & Eglen, 2017; Foglietta et al., 2020).

#### 3.2.8.6.1 Přírodní nosiče

Nejvyužívanějším přírodním nosičem je Matrigel<sup>TM</sup>, hydrogelová matrice obsahující extrakt bazální membrány získaný z Engelbreth-Holm-Swarm myšního tumoru. Tvorba Matrigelu<sup>TM</sup> vyžaduje ochlazení veškerého materiálu, jakožto preventivního

kroku před předčasnou a nevratnou polymerizací hydrogelu, která nastává už při 4° C. Díky svému přírodnímu původu obsahuje Matrigel™ pro ECM specifické signální molekuly a vazebné domény jako je laminin, kolagen, elastin, entactin, fibronectin, MMP, fibrogen a různé růstové faktory. Výhodou je poskytování podobných strukturálních interakcí jako *in vivo* matrice a umožňuje tak proliferovat různým buněčným liniím. Nevýhodou, kromě pracné přípravy, je i velká variabilita mezi šaržemi a tím způsobená nízká reprodukovatelnost (Fang & Eglen, 2017).

Další přírodní gely jako je kolagen, kyselina hyaluronová, alginát a další se také používají ke tvorbě sféroidů. Důležité výhody a nevýhody přírodních nosičů jsou shrnuty v Tabulce 1. Kolagenové nosiče mohou být sestaveny fyzikálním nebo chemicko-enzymatickým zesíťováním. Třeba již zmíněný kolagen se běžně vyskytuje v mikroprostředí nádoru a s jeho růstem se více ukládá. Tyto přírodní materiály obsahují důležité domény buněčné adheze a spouští buněčnou signalizaci vedoucí k morfologii a genové expresi obdobně jako v *in vivo*. Nicméně, nosiče tvořené kolagenem jsou přírodního původu, a tak stejně jako u Matrigelu™, je riziko v rozdílnosti u jednotlivých šarží. Mezi další zkoumané a používané přírodní materiály pro tvorbu 3D buněčných modelů patří kyselina hyaluronová. Důležitý glykosaminoglykan vyskytující se ve zdravé, ale i v nádorové tkáni ECM. Ukazuje se, že kyselina hyaluronová má spojitost s progresí nádorů a její zvýšené množství ve stroma nádorů znamená pro pacienta horší prognózu. Spojitost kyseliny hyaluronové s mikroprostředím nádoru je zkoumána v mnoha studiích. Je tedy snaha o zavedení tohoto přírodní nosiče pro vytváření sféroidů *in vitro* (Ferreira et al., 2018).

**Tabulka 1** Výhody a nevýhody přírodních materiálů využívaných pro tvorbu sféroidů technikou nosičů. Upraveno z (Ferreira et al., 2018).

Výhody	Nevýhody
Obsahují domény vyskytující se v <i>in vivo</i> systémech (např. elastin, fibronectin)	Není známo přesné složení
Vytvářejí interakce buňka-ECM přítomné <i>in vivo</i>	Variabilita mezi šaržemi
Mají vlastnosti buněčné adheze	Omezená kontrola nad tuhnutím nosiče
Enzymaticky rozložitelné a cenově dostupné	Mohou být vyžadovány další úpravy k napodobení složek tkáňové ECM <i>in vivo</i>

### 3.2.8.6.2 *Syntetické nosiče*

Alternativou k přírodním nosičům jsou syntetické materiály na bázi polymerů. Lze je přesně strukturálně i chemicky definovat, a tak vyrobit nosič, který napodobuje ECM a nabízí se i možnost modifikací biofyzikálních vlastností. V literatuře se jako nejpoužívanější biopolymery uvádí polyethylenglykol (PEG), polyaktid (PLA) a polyglykolid (PGA). Tyto polymery jsou bioaktivní, biokompatibilní a biologicky odbouratelné. Tím, že lze přesně definovat složení, odpadá problém s různou variabilitou šarží. I přes tyto výhody se ukazuje, že buňky kultivované pouze na čistých syntetických nosičích mohou postrádat vzory genové exprese podobné nádoru nebo lékově rezistentní fenotyp v porovnání s fenotypem *in vivo*. Předpokládá se, že tato záležitost ovlivňuje produkci robustních tumor-napodobujících 3D modelů *in vitro*. Překonat tyto nedostatky lze kombinací s jiným polymerem, např. polyvinylalkoholem nebo přidáním přírodního biopolymeru jako je chitosan nebo kyselina hyaluronová, a více tak napodobit podmínky blížící se *in vivo* (Duval et al., 2017).

## 4 CÍLE PRÁCE

- Tvorba sféroidů metodou ULA destiček z buněčných linií CT-26 a MCF-7. Stanovení optimální počáteční koncentrace buněk.
- Sledování rychlosti růstu a uniformity u sféroidů buněčných linií CT-26 a MCF-7.
- Stanovení fotodynamické aktivity látek P40, P44, PhotoSens® a ZIP300 u buněčných linií CT-26 a MCF-7 na 3D modelu.
- Porovnání vyhodnocení cytotoxicity metodou AlamarBlue™ a CellTitre-Glo® u buněčných linií CT-26 a MCF-7.
- Zavést model invazivity sféroidů a aplikovat jej u sféroidů ovlivněných fotodynamickým působením amfifilního kationického PS (P40), amfifilního anionického PS (P44), hydrofilního anionického PS (Photosens®) a hydrofilního kationického PS (ZIP300).
- Stanovit lokalizaci studovaných látek ve sféroidech.



# 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 5.1 Laboratorní vybavení pro práci s buněčnou linií

### 5.1.1 Pracovní pomůcky

- 96-jamková mikrodestička Nunclon™ Sphera™, kulaté dno (ThermoFisher Scientific, USA)
- automatické pipety, různý rozsah (Eppendorf, Německo)
- 96-jamková mikrodestička bílá (ThermoFisher Scientific)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- Pasteurovy pipety, sterilní (Brand)
- sterilní inkubační nádoby T75, plastové (TPP, Švýcarsko)
- sterilní laboratorní sklo (Simax, Česká republika)
- sterilní mikrozkuřavky, různý objem (Eppendorf)
- sterilní pipety, plastové, různý objem (TPP)
- sterilní plastové vaničky (Eppendorf)
- sterilní stříkačkový filtr s póry 0,2  $\mu\text{m}$ , průměr 13 mm (Fisher Scientific, Česká republika)
- sterilní stříkačkové filtry s póry 0,22 a 0,45  $\mu\text{m}$ , průměr 33 mm (TPP)
- sterilní špičky, plastové, různý rozsah (Eppendorf)
- sterilní sítko pro 50 ml falkonky s póry 40  $\mu\text{m}$  (Greiner, Rakousko)

### 5.1.2 Pracovní přístroje

- 450 W xenonová lampa Newport s vodním a high-pass filtrem OG570 (Newport Corporation, USA)
- buněčné inkubátory s termostatem a regulací koncentrace CO<sub>2</sub> (Sanyo, Japonsko a Esco, USA)
- centrifuga Hermle Z 300 (Hermle Labor Technik, Německo)
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- invertovaný epifluorescenční mikroskop Nikon TiE (Nikon, Japonsko)
- vodní lázeň (Memmert, Německo)
- kryostat LEICA CM3050S (Leica biosystem, USA)

### 5.1.3 Použité reagensie

- fetální bovinní sérum (FBS; Sigma-Aldrich, Německo)
- fosfátový pufr (PBS, tablety; Sigma-Aldrich)
- fotosensitizer P40 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- fotosensitizer P44 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- fotosensitizer Photosens® (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- fotosensitizer ZIP300 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- Geltrex® (ThermoFisher Scientific)
- kultivační médium DMEM (Lonza, Belgie)
- paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)
- AlmarBlue™ (ThermoFisher scientific)
- pufr HEPES, 1M (Sigma-Aldrich)
- penicilin/streptomycin (Lonza)
- roztok peroxidu vodíku, 3% (Fluka, Německo)
- roztok trypsin/EDTA (Lonza)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- trypanová modř (Sigma-Aldrich)
- ultraglutamin I (Lonza)
- CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, USA)
- paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)
- fluorescenční sonda Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA)
- mrazící médium Leica CM1950 (Leica Microsystem, Německo)

## 5.2 Buněčné linie CT26 a MCF-7

MCF-7 je buněčná linie karcinomu prsu izolovaná v roce 1970 od Frances Mallonové. MCF-7 – Michigan Cancer Foundation-7, institut v Detroitu, který buněčnou linii izoloval. Tato a další buněčné linie nádorů prsu jsou uváděny ve více jak dvou třetinách publikací zaměřených na studium karcinomu prsu.

CT-26 je myší buněčná linie kolorektálního karcinomu. Buňky jsou klonem nediferencované buněčné linie karcinomu tlustého střeva indukované N-nitroso-N-methylrethanem. Jsou vhodné pro tvorbu nádorů a metastáz díky své odolnosti a možnosti dlouhodobější kultivace.

### 5.2.1 Kultivační médium

Při přípravě kultivačního média SCM (DMEM médium obsahující sérum) je důležité si potřebné roztoky vytemperovat na teplotu 37 °C ve vodní lázni. Ultraglutarin a HEPES pufr se neohřívají. Smíchání všech roztoků se provádí ve sterilním prostředí laminárního boxu. K DMEM médiu jsme přidali 50 ml fetálního bovinního séra, 5 ml 1M HEPES pufru, 10 ml 200mM ultraglutarinu I a 5 ml roztoku penicilinu/streptomycinu. Hotové médium bylo uchováváno v lednici a před použitím bylo nutné ho ohřát na 37 °C.

### 5.2.2 Pasážování buněk

Pasážování buněk je proces, kdy jsou buňky v pravidelných intervalech přenášeny z původní kultivační láhve do nové. Pro obě linie byly používány kultivační láhve T75. Pasážování buněk se provádělo vždy v laminárním boxu za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci buněk a bylo nutné si nechat ohřát potřebné roztoky ve vodní lázni na 37 °C. Před každým pasážováním bylo nutné mikroskopicky zkontrolovat nárůst buněk a zda nedošlo ke kontaminaci kultury.

Z kultivační lahve se nejprve odebralo staré médium, a poté se buňky opláchly roztokem PBS (2 × 5 ml). U buněčné linie CT-26 se po odstranění veškerého PBS použila

acutasa sloužící k oddělení buněk ode dna kultivační láhve (2 ml). Uzavřenou kultivační lahev jsme v inkubovali při laboratorní teplotě a pravidelně jsme pod mikroskopem kontrolovali, že došlo k oddělení buněk ode dna kultivační lahve. Poté jsme přidali 9 ml SCM a důkladně promíchali. Protože buňky buněčné linie CT-26 se často shlukují, bylo nutné pro oddělení buněk ze shluků na jednotlivé buňky suspenzi důsledně promíchat nasátím a vysátím a pro dosažení ještě lepšího výsledku jsme suspenzi buněk přefiltrovali přes buněčné sítko o velikosti pórů 40  $\mu\text{m}$ . Následně jsme si připravili novou kultivační láhev s 15 ml nového ohřátého SCM, do kterého se napipetovala část buněčné suspenze. Buňky se s novým SCM museli důkladně promíchat a následně se kultivační láhev vložila do inkubátoru. Opatrnými pohyby lahvi se dosáhlo rovnoměrného rozložení buněčné suspenze po celém dnu lahve. Zbylá buněčná suspenze se využila na potřebné experimenty. Pasážování buněčné linie MCF-7 probíhalo stejným postupem, jen nebylo nutné buněčnou suspenzi filtrovat a k uvolnění buněk byl použit trypsin při 37°C. Kultivace obou buněčných kultur probíhala při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a konstantní vlhkosti 3-4 dny.

### **5.2.3 Stanovení počtu životaschopných buněk**

Pro zjištění počtu buněk se používala Bürkerova komůrka a 0,4% trypanová modř. Trypanová modř je azobarvivo používané k vitálnímu barvení na základě své selektivní schopnosti zadržovat se v poškozených buňkách. To znamená, že živé buňky zůstanou neobarvené a mrtvé buňky budou modré.

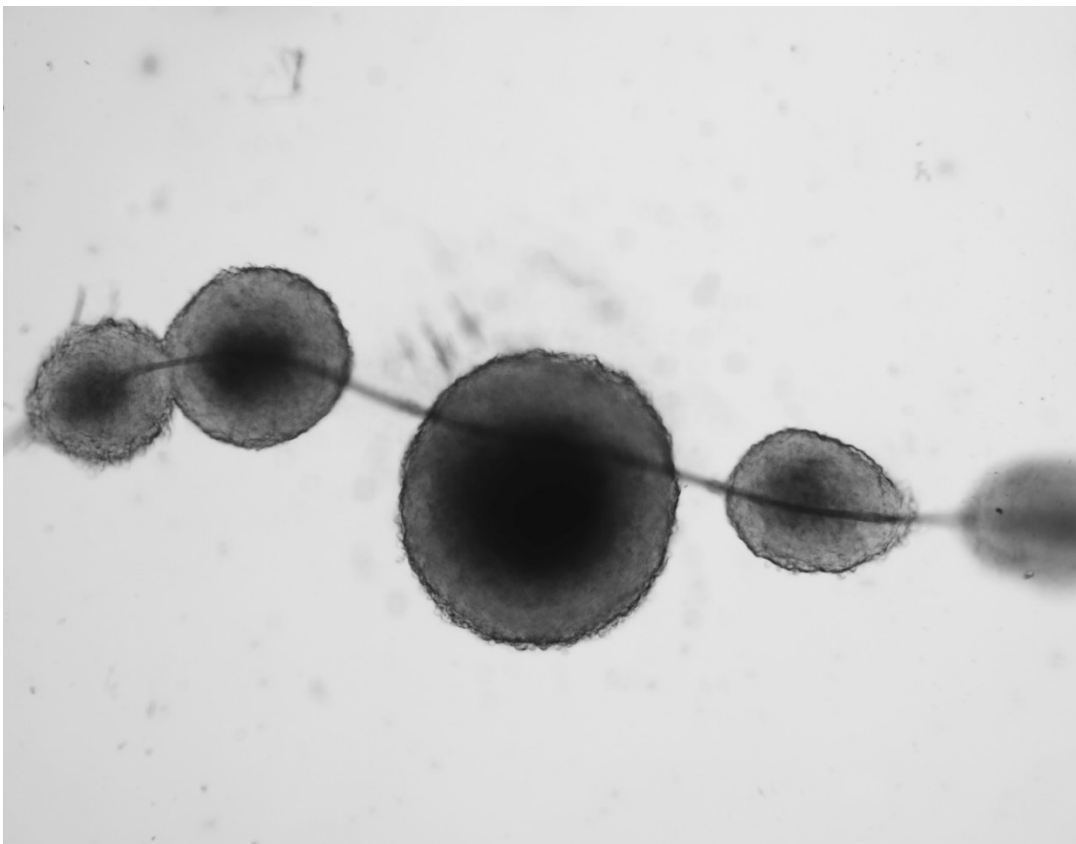
Z buněčné suspenze zbylé po pasážování se odebral vzorek, který byl přidán do připravené zkumavky s trypanovou modří v poměru 1:1. Zkumavka se důkladně zvortexovala a poté bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  roztoku trypanové modří s buněčnou suspenzí do každé poloviny Bürkerovy komůrky. Obě poloviny Bürkerovy komůrky jsou rozděleny na devět velkých čtverců a buňky byly spočítány v pěti čtvercích pomocí objektivu 10 $\times$ . Výsledný počet živých buněk na ml média jsme zjistili výpočtem.

## 5.3 Tvorba 3D sféroidů

Sféroidy jsme u obou buněčných linií vytvořili metodou ULA destiček.

### 5.3.1 Příprava buněčné suspenze pro experimenty

Vytvoření buněčné suspenze opět bylo prováděno v laminárním boxu. Abychom zajistili správnou tvorbu sféroidů, bylo vhodné všechny roztoky vždy před použitím přefiltrovat přes filtr s velikostí pórů 22  $\mu\text{m}$ , kvůli odstranění mikroskopických částic prachu obsaženého např. v PBS. V běžných laboratořích však není možné dosáhnout bezprašného prostředí, ale filtrací roztoků lze prašnost minimalizovat. Problém spočívá v tom, že pevné částice v roztocích vytváří pro buňky adhezní povrch, na který přilnou a začnou tvořit sféroid. Ten ale získává nepravidelný tvar, nebo dojde ke tvorbě několika menších buněčných mas (Obrázek 12), což není žádoucí pro experimenty.



**Obrázek 12** Několik menších sféroidů formovaných na vláknech, které se do buněčné kultury dostalo pravděpodobně z laboratorního skla či PBS pufry použitého při pasážování.

### 5.3.2 Vytvoření sféroidů pomocí ULA destiček

200  $\mu$ l buněčné suspenze jsme automatickou pipetou napipetovali do 96-jamkové ULA destičky. Připravené destičky jsme vložili do centrifugy a točili při 120  $\times$ g 5 min. Po centrifugaci jsme pod mikroskopem zkontrolovali, jestli se začali buňky shlukovat uprostřed na dně jamky. Během následujících dnů došlo k vytvoření sféroidů. Buněčné suspenze pro tuto metodu byly vytvořeny v počátečních koncentracích 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku.

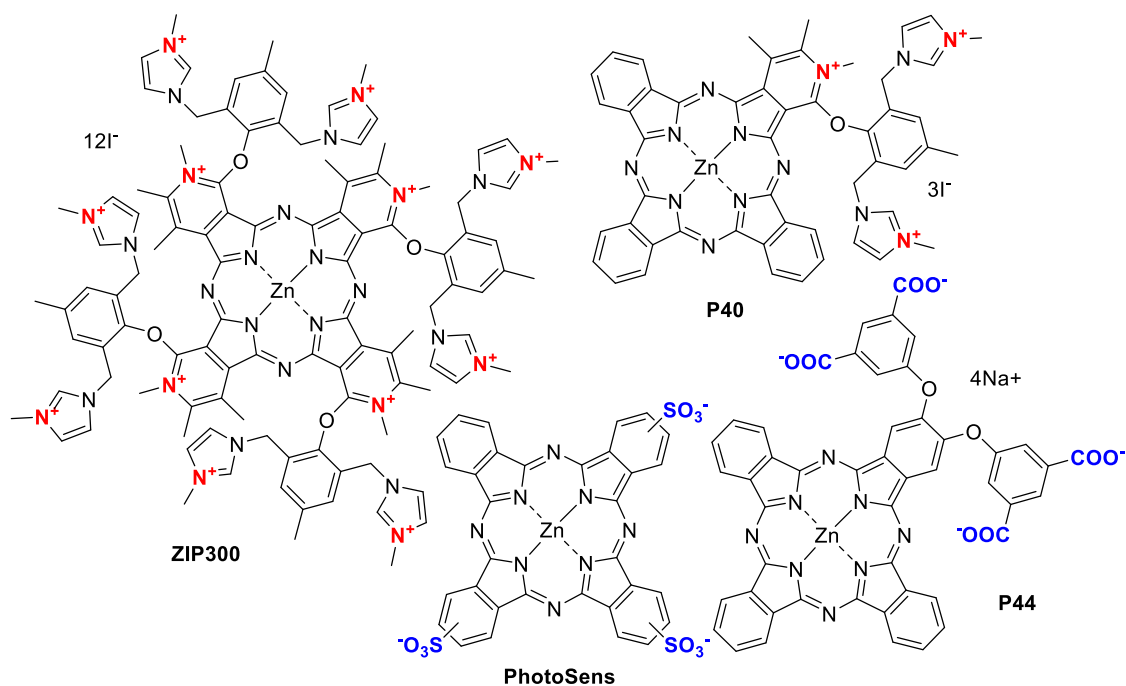
### 5.4 Růst a uniformita sféroidů

Sféroidy z obou buněčných linií vytvořené pomocí ULA 96-jamkové mikrotitrační destičky, byly po dobu čtrnácti dní foceny a byl zaznamenáván jejich růst. Byla použita mikroskopie v diferenciálním interferenčním kontrastu (DIC) s 4 $\times$  objektivem. Velikost sféroidů byla zjištěna měřením jejich průměrů. Ty jsme získali průměrem čtyř změřených hodnot v různých místech sféroidu.

### 5.5 Fototoxicita vybraných fotosenzitizerů

Pro naše experimenty byly vybrány tyto kandidátní látky z různých skupin PSs – amfifilní kationická P40, amfifilní anionická P44, hydrofilní anionický PhotoSens® a hydrofilní kationický ZIP300. PS (vyjma PhotoSens®) byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv FaF UK vědeckou skupinou prof. Zimčíka. Jedná se o látky citlivé na světlo, proto je nutné s nimi pracovat ve tmě, abychom předešli předčasně aktivaci PSs.

P40, P44 a ZIP300 patří do skupiny ftalocyaninů (Pc) a azaftalocyaninů (AzaPc) s centrálně koordinovaným atomem zinku. PhotoSens® je hlinitý Pc (Obrázek 13). PhotoSens® je o směsí ftalocyaninů, které jsou di- a tri- (v menší míře také až tetra-) substituované sulfonovou funkční skupinou.



**Obrázek 13** Struktury studovaných fotosenzitizérů. PhotoSens® je zde zobrazený jako trisulfonovaný derivát.

### 5.5.1 Xenonová výbojka jako zdroj záření

U tohoto experimentu jsme používali PSs v koncentracích 0,5 – 10  $\mu\text{M}$ . Před přidáním PS bylo nutné vyměnit 100  $\mu\text{l}$  média za médium obsahující PSs o potřebné koncentraci. Jako pozitivní kontrolu jsme zvolili 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  a negativní kontroly byly vybrány sféroidy, kde došlo pouze k výměně 100  $\mu\text{l}$  média za čerstvé. PSs jsme nechali přes noc inkubovat (12 h).

Druhý den jsme sféroidy minimálně třikrát opláchli čistým médiem (100  $\mu\text{l}$ ). Důležitý krok pro odstranění nenavázaného PSs. Následně jsme destičky ozařovali 15 min xenonovou lampou ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ , 12,4  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , 15 min, 22,4  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Sféroidy jsme nechali do druhého dne v inkubátoru a poté byla vyhodnocena životaschopnost pomocí AlmarBlue<sup>TM</sup> (AB) a CellTiter-Glo® (aktivita ATP).



## 5.5.2 Hodnocení životaschopnosti sféroidů

Životaschopnost buněk je definována jako počet živých buněk ve vzorku a je důležité její stanovení v experimentech zahrnující přežití nebo smrt buněk po vystavení toxickým látkám. Bez ohledu na typu použitého testu, je důležité vědět, kolik životaschopných buněk zbylo na konci experimentu. Existuje celá řada metod založených na různých buněčných funkcích, jako je aktivita enzymu, permeabilita buněčné membrány, přilnavost buněk nebo produkce ATP. Pro zvolení optimálního testu životaschopnosti buněk, je třeba podrobně zvážit buněčný model, podmínky použité kultivace a co je očekáváno od dané analýzy (Adan et al., 2016).

Pro naše experimenty jsme zvolili pro stanovení životaschopnosti buněk u obou buněčných linií běžně používaný test založený na přeměně resazurinu na resorufin (komerčně dostupný jako AB) a test založený na stanovení ATP.

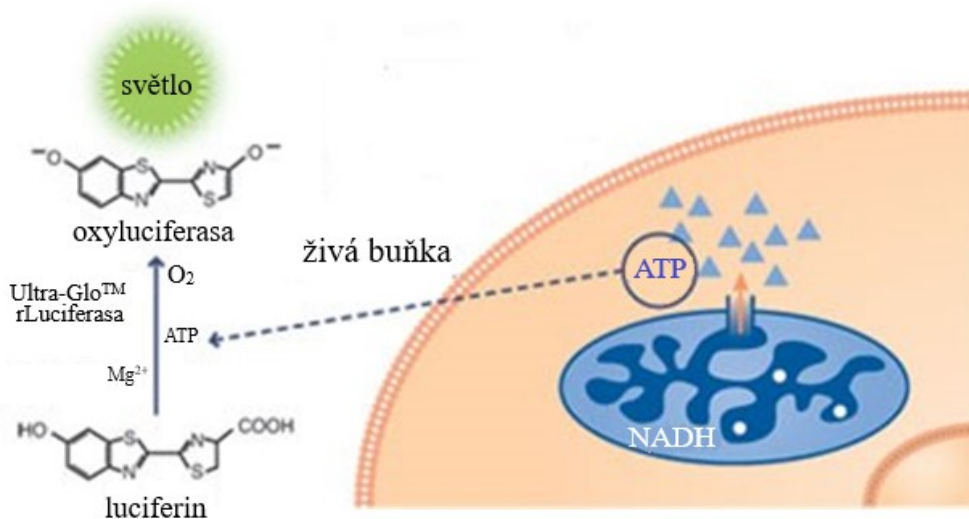
### 5.5.2.1 AlamarBlue™

Resazurin je fenoxazinové nefluorescenční barvivo, které proniká do buněk, kde je pomocí intracelulárních redukčních enzymů přeměněno na fluorescenční barvivo resorufin. Resazurin má modrou barvu a redukuje se na růžový, vysoce fluorescenční resorufin (Hamalainen-Laanaya & Orloff, 2012).

Z destičky jsme opatrně odebrali 150  $\mu\text{l}$  média a přidali jsme 50  $\mu\text{l}$  20% AB (zředěný předeřátým SCM médiem), který byl přefiltrován filtrem s póry 0,22  $\mu\text{m}$  pro odstranění krystalů. Sféroidy byly s AB inkubovány 4 hodiny v inkubátoru. Pro změření fluorescence bylo nutné přenést zredukované AB z ULA destička do nové 96-jamkové mikrotitrační TPP destičky s plochým dnem. Pracovali jsme tak, abychom nenasáli sféroidy a nevytvořili se nám bubliny, proto jsme pipetovali reverzně. Intenzitu fluorescence jsme měřili na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 při  $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{emi}} = 590 \text{ nm}$ . Naměřené hodnoty byly zpracovány v Microsoft Office Excel. Výsledek byl vyjádřen procentuálně vztažením k neovlivněné kontrole po odečtení pozadí (signál z usmrcených sféroidů). Grafy byly zpracovány v programu GraphPad Prism 8.4.3.

### 5.5.2.2 Stanovení ATP

Jako druhou metodu pro průkaz životaschopnosti buněk jsme zvolili analýzu ATP, jakožto klíčového biomarkeru aktivních (živých) buněk. Používali jsme luminiscenční analýzu životaschopnosti buněk CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay. Jedná se o homogenní metodu, která kvantifikuje přítomné ATP, které signalizuje přítomnost metabolicky aktivních buněk. Metodika vede k lýze buněk a generování luminiscenčního signálu je úměrné množství přítomného ATP. CellTiter-Glo® závisí na vlastnostech patentované termostabilní luciferasy (Ultra-Glo™-rekombinantní luciferasa), která generuje stabilní luminiscenční signál (S. Kessel et al., 2017) (Obrázek 14).



**Obrázek 14** Luciferasova reakce. Monoxidace luciferinu je katalyzována luciferasou v přítomnosti Mg<sup>2+</sup>, ATP a molekulárního kyslíku. Buňka je zdrojem ATP v luciferasove reakci, takže vytvořená luminiscence je úměrná počtu životaschopných buněk. Upraveno z promega.com

CellTiter-Glo® se skladuje v mrazáku a je nutné ho nechat před použitím rozmraznou v lednici. Pro luminiscenční analýzu jsme používali speciální bílé 96-jamkové mikrotitrační destičky. Bylo tedy nutné z jamek ULA destiček odebrat 50 µl SCM média se sféroidy a přenést je do bílé destičky. Následně jsme přidali 50 µl reagentie, zabalili jsme destičku do alobalu a třepali 5 minut na třepačce. Poté jsme destičku nechali inkubovat 25 minut při pokojové teplotě. Intenzitu luminiscenčního záření jsme měřili na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200. Naměřené hodnoty byly zpracovány v Microsoft Office Excel. Výsledek byl vyjádřen procentuálně vztahem k neovlivněné

kontrole po odečtení pozadí (signál z usmrcených sféroidů). Grafy byly zpracovány v programu GraphPad Prism 8.4.3.

## 5.6 Test invazivity

Pro obě buněčné linie jsme vytvořili sféroidy metodou ULA destiček. Nasadili jsme 500 buněk/jamku a nechali jsme je 7 dní růst v inkubátoru při 37°C.

Abychom prokázali invazivní schopnost buněk, využili jsme jako zdroj ECM Gelrex™. Ten je nutné den předem nechat rozmrznout v lednici. Vzhledem k tomu, že Geltrex™ při teplotách vyšších než 15 °C začíná tuhnout, je s ním důležité pracovat rychle. Je také nutné si den předem ve sterilních nádobách zmrazit špičky. Pipetou jsme opatrně odsáli 150 µl média, abychom neodsáli sféroidy a destičku se sféroidy dali vychladit na 10 minut do lednice. Vychlazenou destičku jsme umístili na chladicí podložku (z mrazáku) a následně jsme ke sféroidům přidali 50 µl Geltrexu™ tak, aby se nevytvořily bubliny a sféroidy zůstal uprostřed jamky. U kontrolních sféroidů bylo místo Geltrexu™ bylo použito SCM médium. Destičku jsme umístili na jednu hodinu do inkubátoru (37 °C) a nechali jsme gel ztuhnout. Po ztuhnutí jsme na gel převrstvili 100 µl SCM. Pracujeme opatrně, aby se nám médium nedostalo pod gel. Všechny úkony pipetou jsme prováděli reverzním pipetováním. Připravenou destičku jsme umístili do inkubátoru u mikroskopu a v pravidelných intervalech byly sféroidy snímány pomocí DIC mikroskopie s objektivem 4×.

### 5.6.1 Test invazivity po PDT

7 dní staré sféroidy (počáteční koncentrace 500 buněk/jamku) buněčné linie CT-26 byly vytvořeny metodou ULA destičky. Sedmý den inkubace jsme ke sféroidům přidali PSs v koncentracích P40 0,5 µM a 1 µM, P44 1 µM a 5 µM, ZIP300 1 µM a 5 µM, PhotoSens® 1 µM a 5 µM, což byly koncentrace vybrané na základě nejvyšší účinnosti v cytotoxických PDT experimentech. Pipetou bylo odebráno 100 µl média a bylo přidáno 100 µl PSs. Destičku jsme zabalili do alobalu, aby nedošlo k předčasné aktivaci PSs a inkubovali jsme do druhého dne při 37 °C (12 h).

Poté jsme sféroidy opláchly od nenavázaného PS a jako zdroj ECM použili Geltrex™ (postup popsán výše). Po zatuhnutí gelu a převrstvení 100 µl SCM média jsme destičky ozařovali xenonovou lampou po dobu 15 minut. Následně jsme ozářené sféroidy fotili DIC mikroskopií s objektivem 4× po dobu 7 dnů a sledovali jsme, jestli dochází k invazivitě do ECM.

## 5.7 Tkáňové řezy

Abychom zjistili, jestli se používané PS dostali do celého sféroidu, rozhodli jsme se pro vytvoření tkáňových řezů ze sféroidů u buněčné linie CT-26.

Sféroidy vytvořené metodou ULA 96-jamkové mikrotitrační destičky o velikosti 3000 buněk/jamku byly staré 7 dní. Pro experiment jsme použili 10 µM PS. Bylo odebráno 100 µl média a přidáno 100 µl PSs v SCM. Destičku jsme zabalili do alobalu, aby nedošlo k aktivaci PSs. Inkubace sféroidů probíhala v inkubátoru do druhého dne (24 h). Následující den jsme opatrně odebrali veškeré médium (200 µl) tak, sféroid nenasáhl do špičky a nepoškodil ho. Dále jsme sféroidy opláchli 100 µl. Poté jsme přidali 200 µl 4% paraformaldehydu a nechali 30 min fixovat při pokojové teplotě. Po uplynutí 30 min jsme všechnu paraformaldehyd odsáli, sféroidy opláchli 200 µl PBS, a přidali 100 µl čistého PBS a skladovali v lednici. Takto zafixované a připravené sféroidy jsme zamrazili v tkáňovém médiu Leica CM1950 při -80 °C. Druhý den byly připraveny 10 µm tlusté řezy. Pro dobarvení jader v tkáňových řezech jsme použili Hoechst 3342 a jednotlivé řezy sféroidů jsme fotili pomocí fluorescenční a DIC mikroskopie.

Pro každou látku bylo vytvořeno 5 preparátů, které se vzájemně významně nelišily. Ve výsledcích je vždy uveden reprezentativní řez.

## 5.8 Statistické zpracování dat

Statistické hodnocení výsledků bylo provedeno pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (one-way ANOVA) s využitím *post hoc* Bonferroniho metody vícenásobného porovnání. Cytotoxické experimenty byly provedeny nejméně ve třech opakováních (vždy v triplikátu). Výsledky byly porovnány s výsledky kontrolních vzorků (neovlivněné kontroly) a za signifikantní byly považovány, pokud hladina významnosti ( $p$ ) byla  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  a  $***p < 0,001$ .

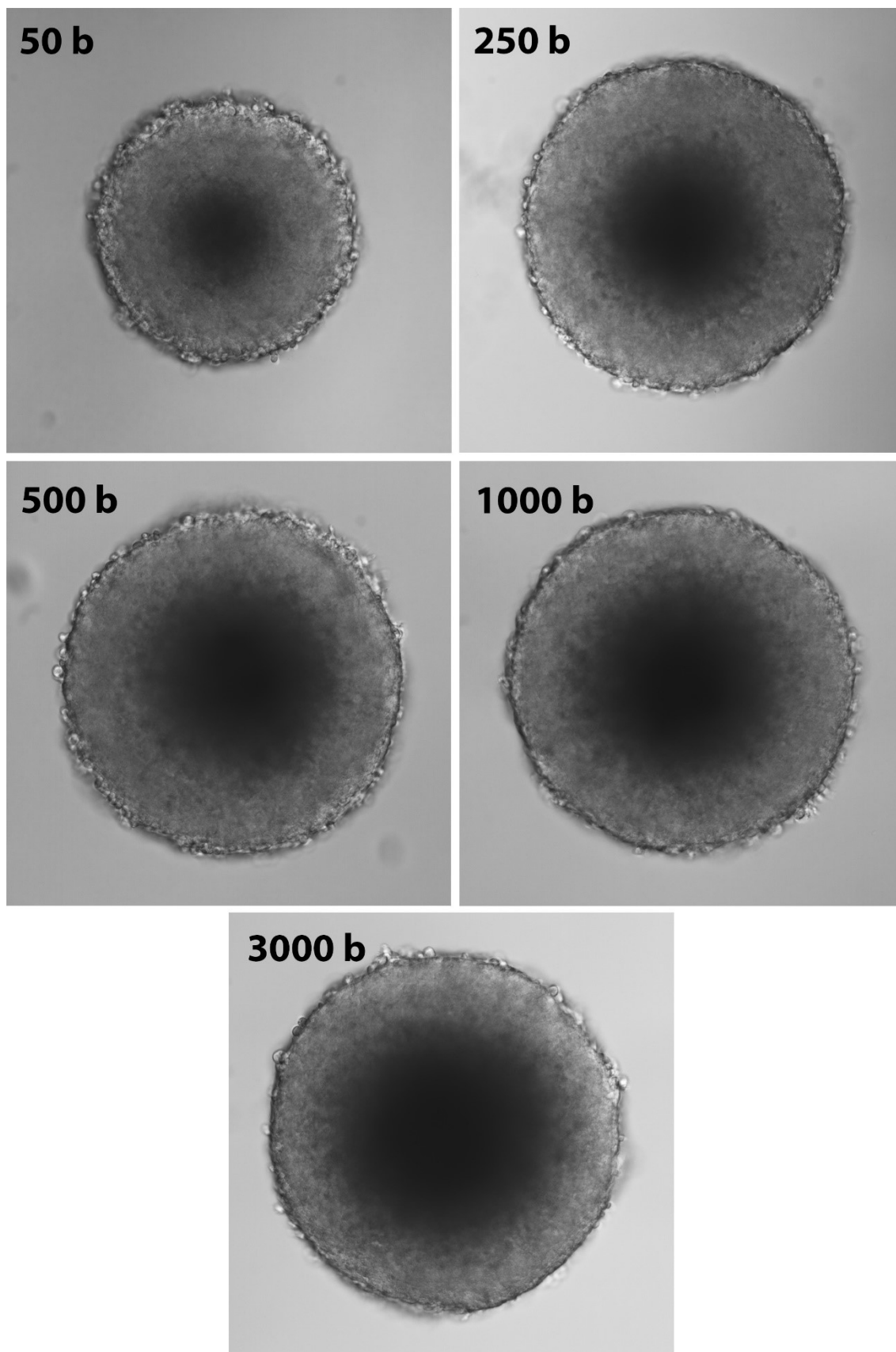
Pro porovnání poměru stran sféroidů byl použit nepárový t-test s Welchovou korekcí. Výsledky byly navzájem porovnány a byly považovány za signifikantní, pokud hladina významnosti ( $p$ ) byla  $*p < 0,033$ ;  $**p < 0,002$  a  $***p < 0,001$ .

## 6 VÝSLEDKY

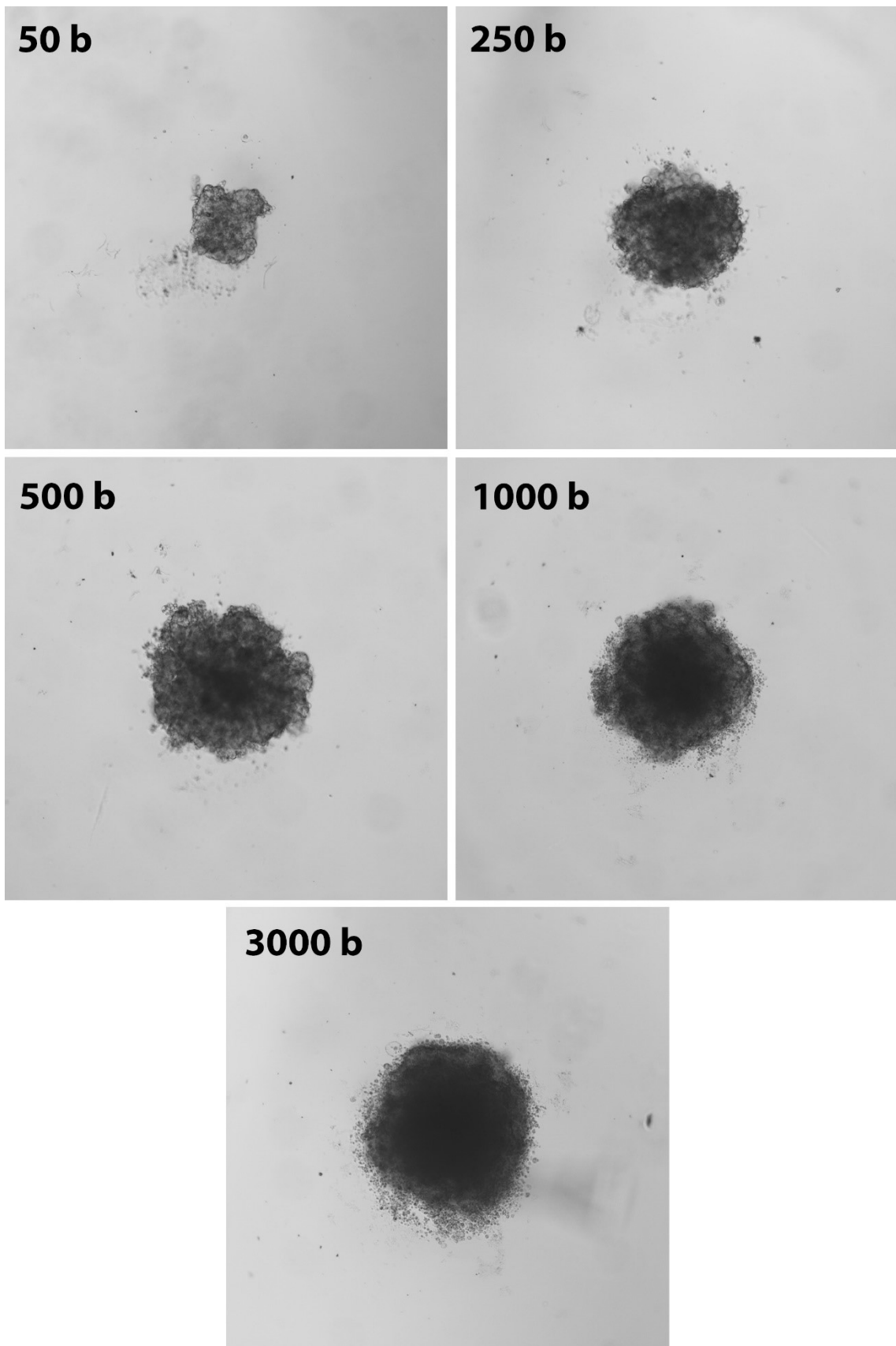
### 6.1 Stanovení počáteční koncentrace buněk pro tvorbu sféroidů

Velikost sféroidů je důležitým bodem v každé experimentální práci. Souvisí to s velikostmi nádorů *in vivo*, které korelují s funkcí buněk, ale také s penetrací a transportem léčiv. To znamená, že správně zvolená velikost sféroidů umožňuje napodobit nádorovou tkáň *in vivo*. V literatuře se uvádí, že sféroidy v rozmezí 200-500  $\mu\text{m}$  jsou dostatečně velké na to, aby se vytvořil dostatečný gradient kyslíku, živin a odpadních látek. Takto velké sféroidy by měly být vhodné k testování protinádorových léčiv nebo pro studium PDT (Shen et al., 2021).

Sféroidy buněčných linií CT-26 a MCF-7 jsme vytvořily metodou ULA destičky s počáteční koncentrací buněk 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku. Sféroidy jsme 7. den zdokumentovali DIC mikroskopií při zvětšení 4 $\times$ . Na Obrázku 15 a 16 jsou zobrazeny sféroidy z buněčné linie CT-26 a MCF-7 v 7. den inkubace. U obou buněčných linií jsme zvolili jako optimální koncentraci 500 buněk/jamku.



**Obrázek 15** Sféroidy buněčné linie CT-26 s počáteční koncentrací 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku 7. den od nasazení. Strana fotky odpovídá 1000  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 16** Sféroidy buněčné linie MCF-7 s počáteční koncentrací 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku 7. den od nasazení. Strana fotky odpovídá 2500  $\mu\text{m}$ .



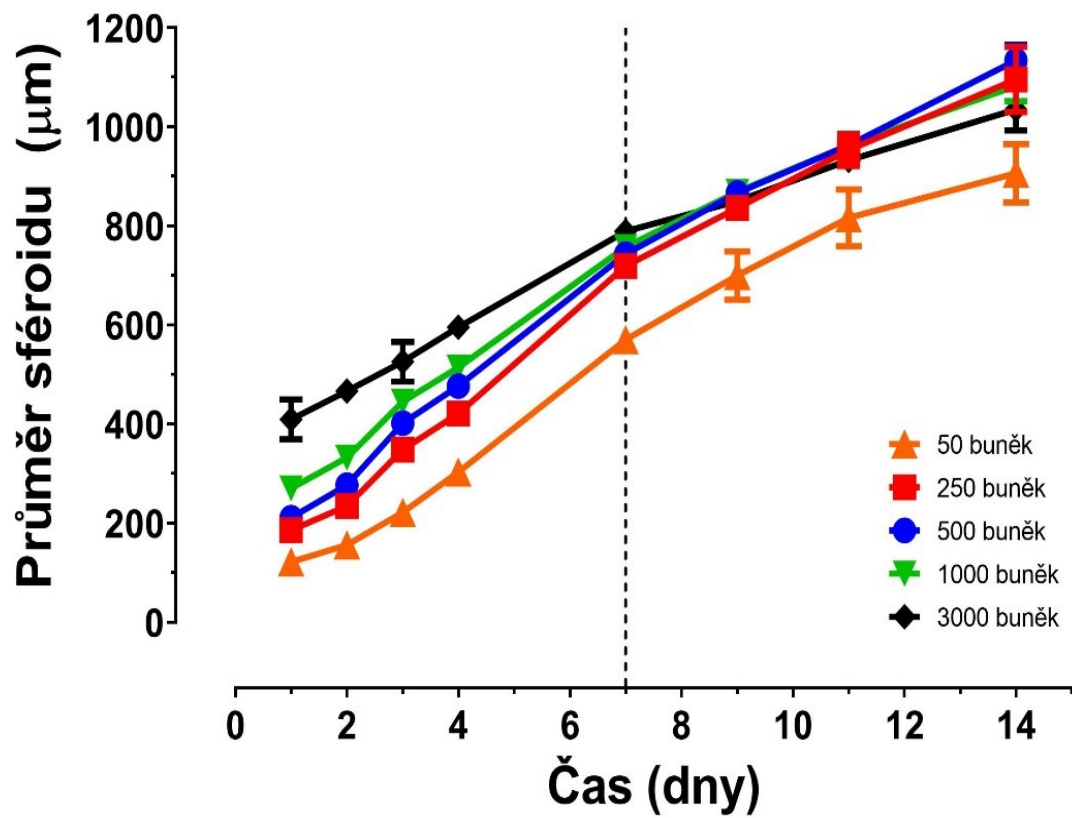
## 6.2 Sledování růstu sféroidů

Sféroidy buněčné linie CT-26 vytvořené metodou ULA destičky v koncentracích 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku jsme zaznamenávali 1., 2., 3., 4., 7., 9., 11. a 14. den od jejich vytvoření. V den vytvoření sféroidu jsme po stočení buněk v ULA destičce již mohli pozorovat agregaci buněk do tvaru podobající se sféroidu. V dalších dnech růstu se stával sféroid více kompaktní a 7. den bylo pozorováno vytvoření sféroidu vhodného pro experimenty u koncentrace 500 buněk/jamku. U všech koncentrací byla zaznamenána lineární závislost růstu. U sféroidů buněčné linie CT-26 byl růst zaznamenáván po dobu 14 dnů DIC mikroskopií při zvětšení 4×. Sféroidy jsme fotografovali a měřili jejich průměr (Obrázek 17 a Obrázek 18).

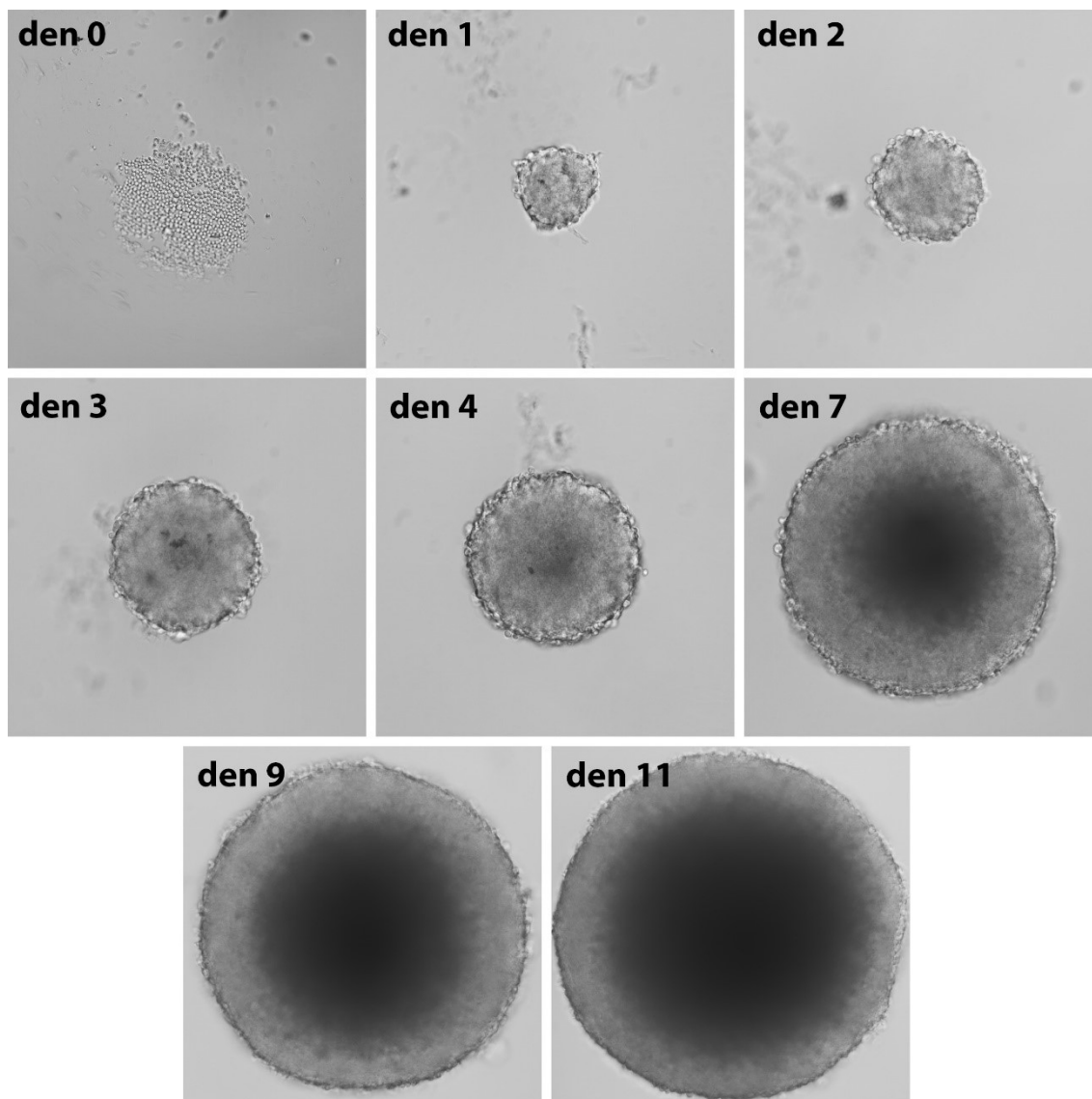
Pro sféroidy buněčné linie MCF-7 jsme použili stejné výchozí koncentrace buněk 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku. Sféroidy jsme dokumentovali 1., 2., 3., 4., 7., 9. a 11. den. Opět jsme ihned po centrifugaci mohli pozorovat tvorbu agregátů nepravidelného tvaru. Sféroidy byly zaznamenávány a byl sledován jejich růst po dobu 11 dnů DIC mikroskopií při zvětšení 4×. Sféroidy jsme fotografovali a měřili jejich průměr (Obrázek 19 a Obrázek 20). V tomto experimentu bylo zjištěno, že sféroidy z této linie jsou kompaktní do 4. dne kultivace. 7. den jsme již zaznamenali rozpadající se sféroidy naznačující umírání jednotlivých buněk. Pro experimenty jsme používali metodu s výměnou média ve 3. den inkubace.

Dynamičtější růst byl zaznamenán u sféroidů z buněčné linie CT-26. Sféroidy buněčné linie MCF-7 měly rychlejší růst v prvních dnech a následně byl růst zpomalen (rozsáhlé umírání buněk, které se hromadí na dně jamek a komplikují analýzu).

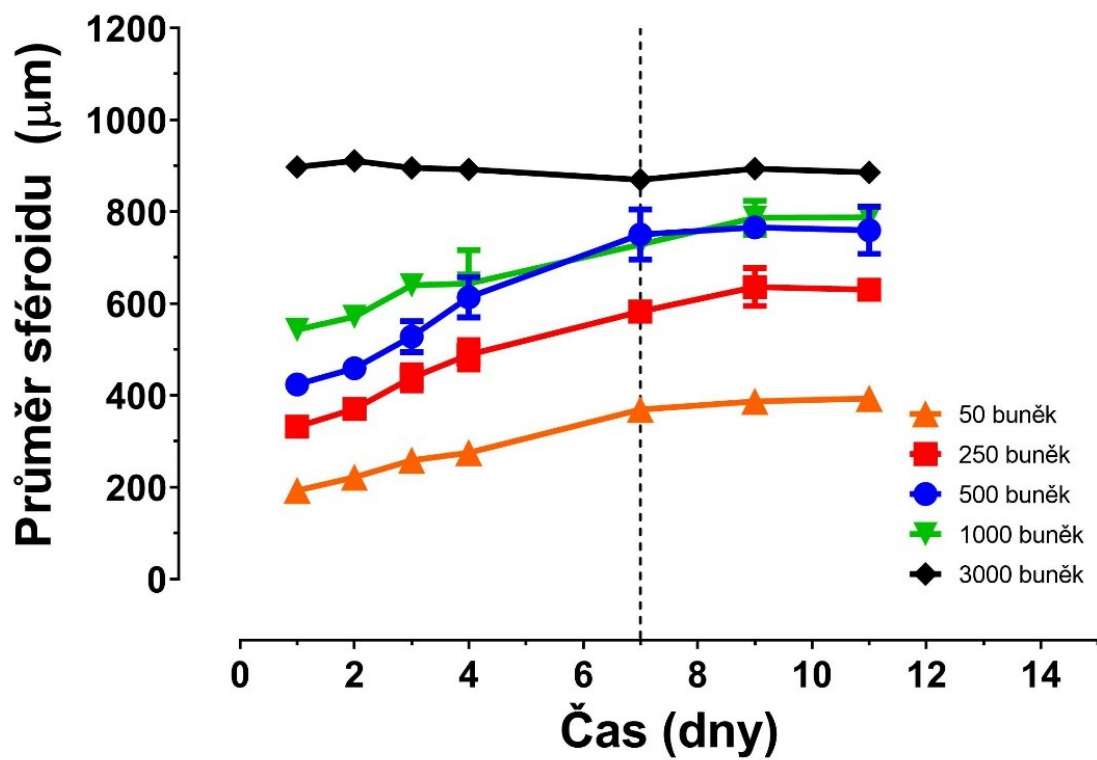
Sféroidy z buněčné linie CT-26 dosáhly v poslední den inkubace přibližně podobných hodnot u všech koncentrací buněk, zatímco u buněčné linie MCF-7 sféroidy vytvořily poslední den inkubace různě velké sféroidy v závislosti na počáteční koncentraci buněk. Sféroidy z buněčné linie MCF-7 vytvářely u všech koncentrací menší sféroidy v porovnání se sféroidy z buněčné linie CT26 a zdá se, že ideálního stavu dosahují mezi 2. a 4. dnem inkubace (u starších sféroidů, pravděpodobně v důsledku umírání jednotlivých buněk, ztrácely kultury sféroidní tvar a získávaly nepravidelný tvar). Toto je však nad rámec této diplomové práce a je vyžadováno další studium.



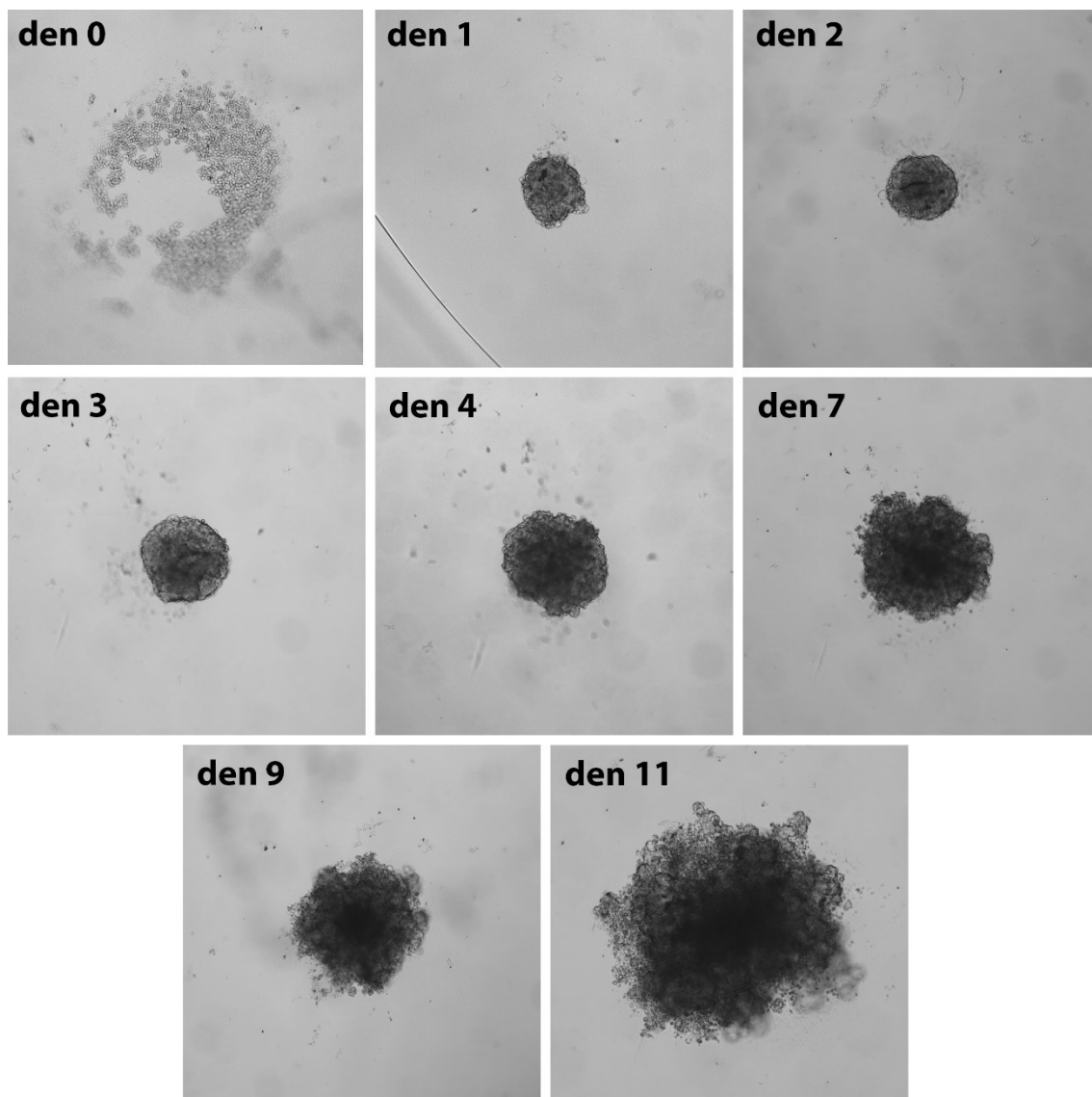
Obrázek 17 Průměry sféroídů buněčné linie CT-26 v závislosti na čase.



**Obrázek 18** Růst sféroidů buněčné linie CT-26 s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku. Strana fotky odpovídá 1000  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 19 Průměry sféroidů buněčné linie MCF-7 v závislosti na čase.

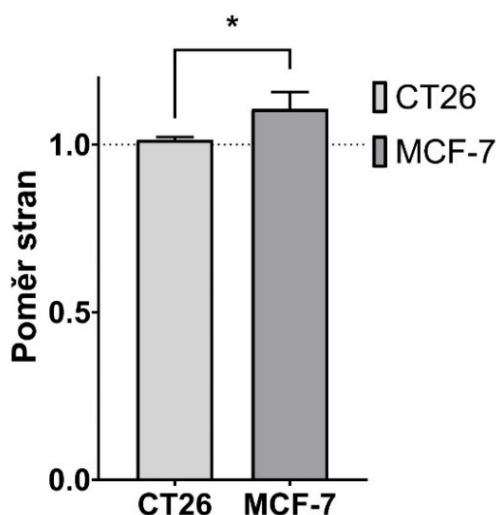


**Obrázek 20** Růst sféroidů buněčné linie MCF-7 s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku.  
Strana fotky odpovídá 2500  $\mu\text{m}$ .

### 6.3 Uniformita sféroidů

Uniformita sféroidů v 7. dni růstu (počáteční koncentrace 500 buněk/jamku) obou buněčných linií se zjišťovala porovnáním poměru dvou na sobě kolmých průměrů sféroidu (nejdelší vůči nejkratší vzdálenosti). Čím více se tento poměr blíží 1,0, tím byl sféroid pravidelnější a kulatější. U nepravidelných sféroidů se hodnota pohybovala výrazně nad hodnotou 1.

Obrázek 21 naznačuje, že sféroidy buněčné linie CT-26 dosahovali uniformních kulatých tvarů, zatímco buněčná linie MCF-7 tvořila méně pravidelné sféroidy v porovnání s buněčnou linií CT-26.



**Obrázek 21** Uniformita sféroidů z buněčných linií CT-26 a MCF-7 vyjádřená jako poměr na sebe kolmých průměrů průřezu.

### 6.4 Vliv výměny média na růst sféroidů buněčné linie CT-26 v ULA destičce

Sféroidy buněčné linie CT-26 jsme připravili metodou ULA destičky s koncentrací 500 buněk/jamku. Vytvořili jsme si takto 2 destičky a v jedné se médium během sedmi denní inkubace neměnilo a v druhé destičce bylo médium měněno 2. a 4. den kultivace. Sféroidy byly dokumentovány a měřeny. Ze získaných průměrů jsme vyhodnotili, že sféroidy bez výměny média dosahovaly 7. den inkubace  $713 \pm 7,9 \mu\text{m}$  a sféroidy s výměnou  $709,1 \pm 8,7 \mu\text{m}$ . Výměna média na růst sféroidů buněčné linie CT-26 neměla vliv.

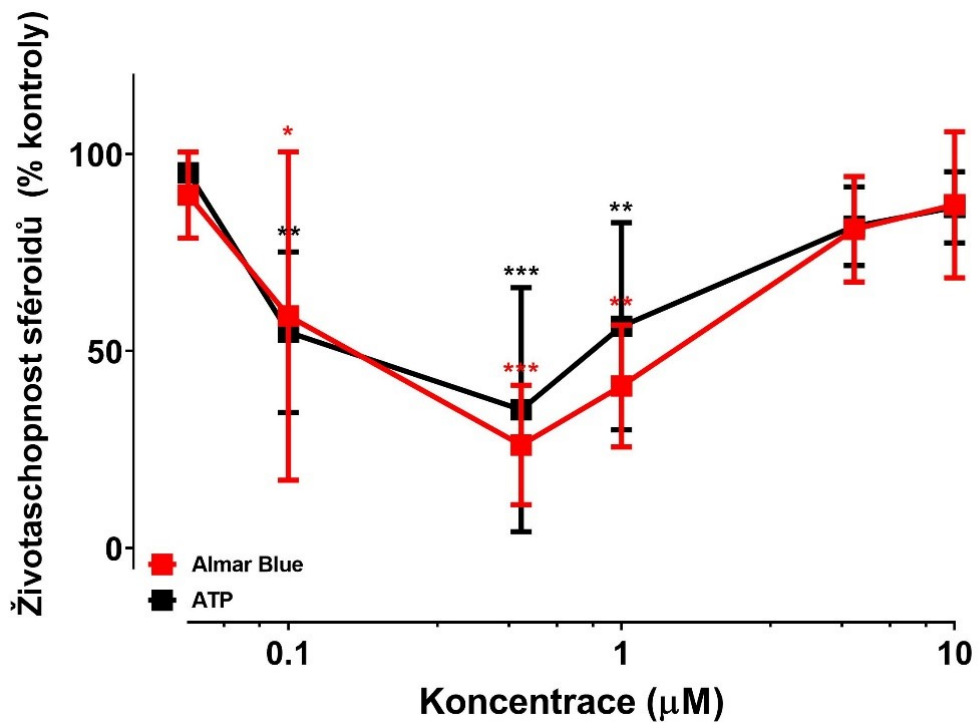
## 6.5 Cytotoxicita

Pro všechny experimenty stanovující fotodynamickou aktivitu byly použity sféroidy s koncentrací 500 buněk/jamku kultivované 7 dní pro buněčnou linii CT-26 i MCF-7. Pro stanovení fototoxicity byly u všech PSs použity koncentrace v rozmezí 0,05 – 10  $\mu\text{M}$ .

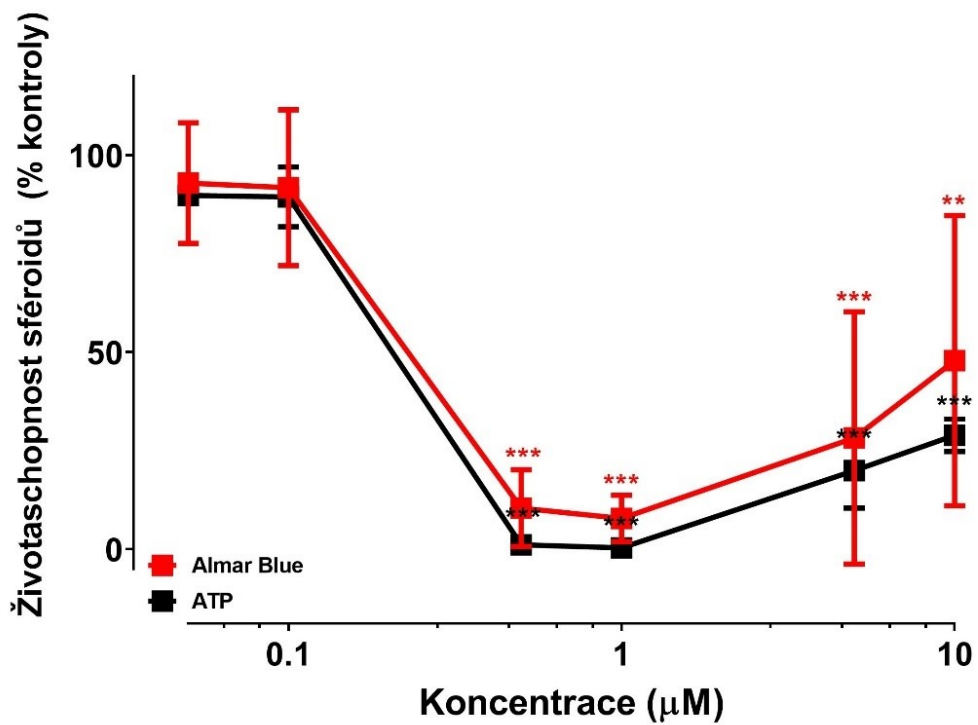
### 6.5.1 P40

U buněčné linie CT-26 je vidět největší pokles životaschopnosti na 35 % u koncentrace 0,5  $\mu\text{M}$  při stanovení aktivitou ATP. Metodou stanovení životaschopnosti AB jsme stanovili hodnotu poklesu při stejné koncentraci na 26 %. U koncentrace 1  $\mu\text{M}$  jsme dosáhli poklesu životaschopnosti na 56 % stanovenou pomocí aktivity ATP. Pomocí stanovení AB jsme získali hodnotu poklesu na 41 % pro stejnou koncentraci. Na Obrázku 22 je vidět, že rozdíl mezi metodami pro stanovení životaschopnosti byl minimální.

U buněčné linie MCF-7 měly nejvyšší letální účinek také koncentrace 0,5  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ . Při hodnocení životaschopnosti metodou AB jsme stanovili hodnoty poklesu na 10 % u 0,5  $\mu\text{M}$  a na 8 % u 1  $\mu\text{M}$ . Stanovením aktivity ATP jsme vyhodnotili pokles životaschopnosti na 1 % u 0,5  $\mu\text{M}$  a na 0,3 % u 1  $\mu\text{M}$ . Na Obrázku 23 je vidět, že rozdíl mezi metodami pro stanovení životaschopnosti byl minimální.



Obrázek 22 Závislost životoschopnosti buněk CT-26 na koncentraci P40 po ozáření.



Obrázek 23 Závislost životoschopnosti buněk MCF-7 na koncentraci P40 po ozáření.

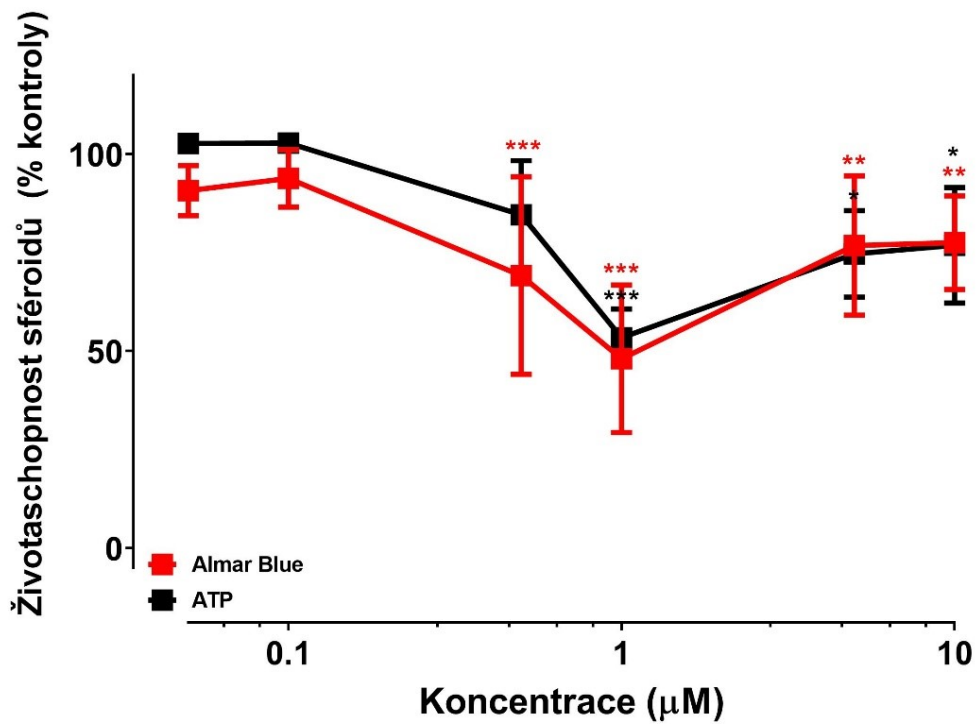


## 6.5.2 P44

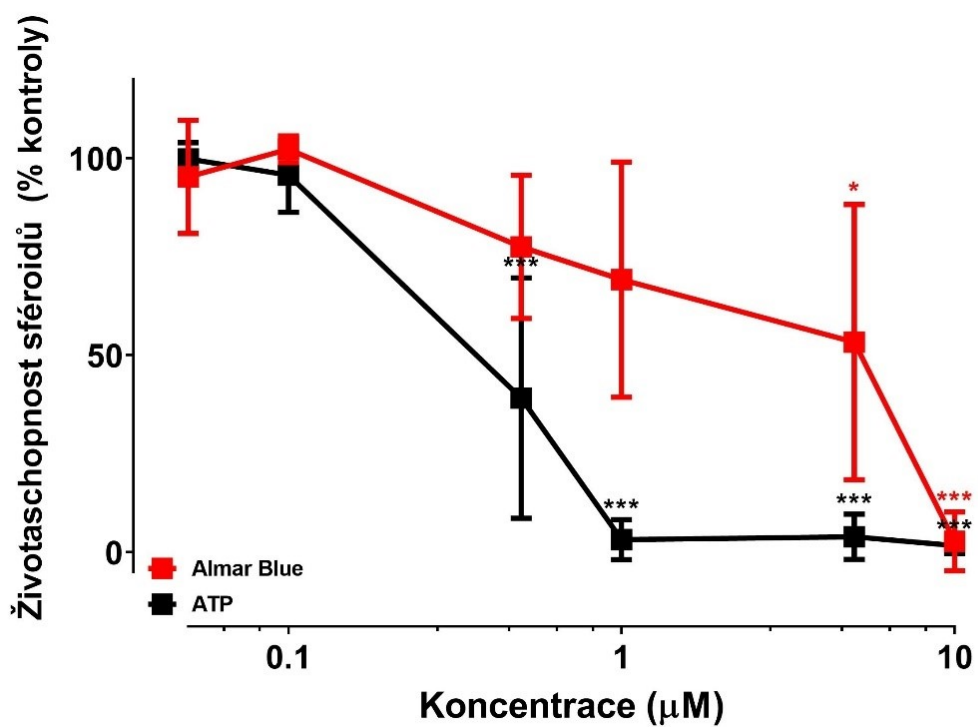
Metodou vyhodnocení AB jsme stanovili u buněčné linie CT-26 nejvyšší pokles životaschopnosti na 51 % u koncentrace 1  $\mu\text{M}$ . Druhou nejvíce účinnou koncentrací byla 0,5  $\mu\text{M}$  s poklesem na 69 %. Při využití stanovení poklesu životaschopnosti aktivitou ATP byly stanoveny hodnoty 53 % u koncentrace 1  $\mu\text{M}$  a 75 % u koncentrace 5  $\mu\text{M}$ . Na Obrázku 24 je vidět, že rozdíl mezi metodami pro stanovení životaschopnosti byl minimální.

U buněčné linie MCF-7 došlo k výraznějšímu poklesu životaschopnosti již u koncentrace 0,5  $\mu\text{M}$  na 39 % u vyhodnocení metodou aktivity ATP. Koncentrace 1  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$  dokázala snížit životaschopnost na 3 %. Koncentrace 10  $\mu\text{M}$  na 1 %. U stanovení životaschopnosti metodou AB byl zaznamenán vyšší pokles u koncentrace 5  $\mu\text{M}$  na 53 %. Největší pokles byl stanoven u koncentrace 10  $\mu\text{M}$ , a to na 3 %. Vyhodnocování bylo citlivější metodou stanovení aktivity ATP – výsledky AB byly ovlivněné významnou chybou způsobenou rozdíly mezi jednotlivými experimenty.

Cytotoxicita látky P44 vyhodnocená metodami AB a aktivitou ATP je zobrazena u buněčných linií CT-26 na Obrázku 24 a MCF-7 na Obrázku 25.



Obrázek 24 Závislost životaschopnosti buněk CT-26 na koncentraci P44 po ozáření.



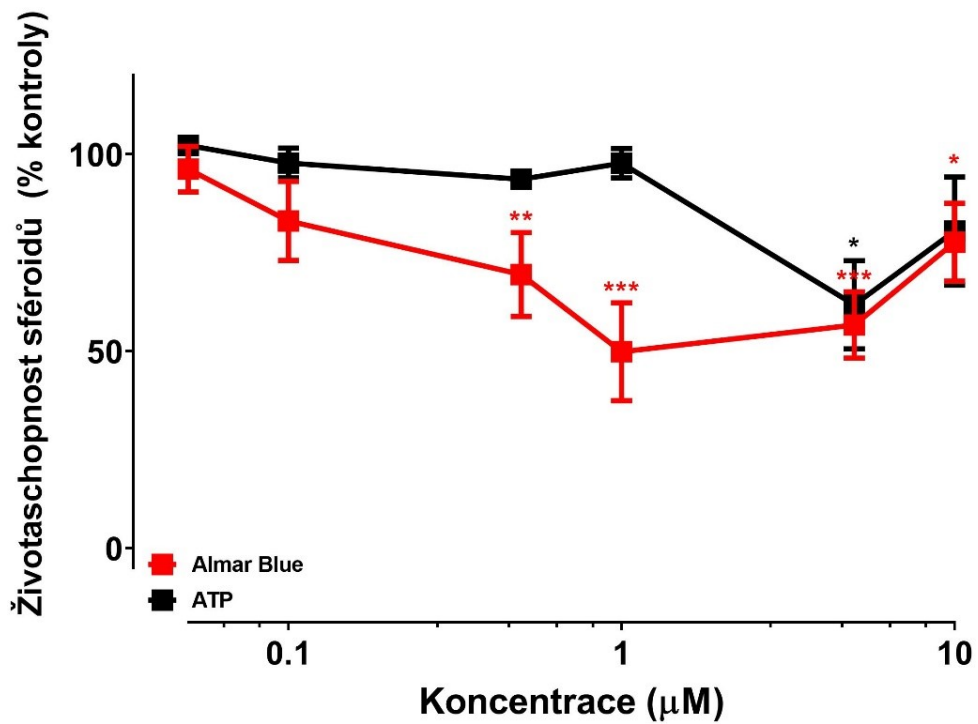
Obrázek 25 Závislost životaschopnosti buněk MCF-7 na koncentraci P44 po ozáření.

### 6.5.3 ZIP300

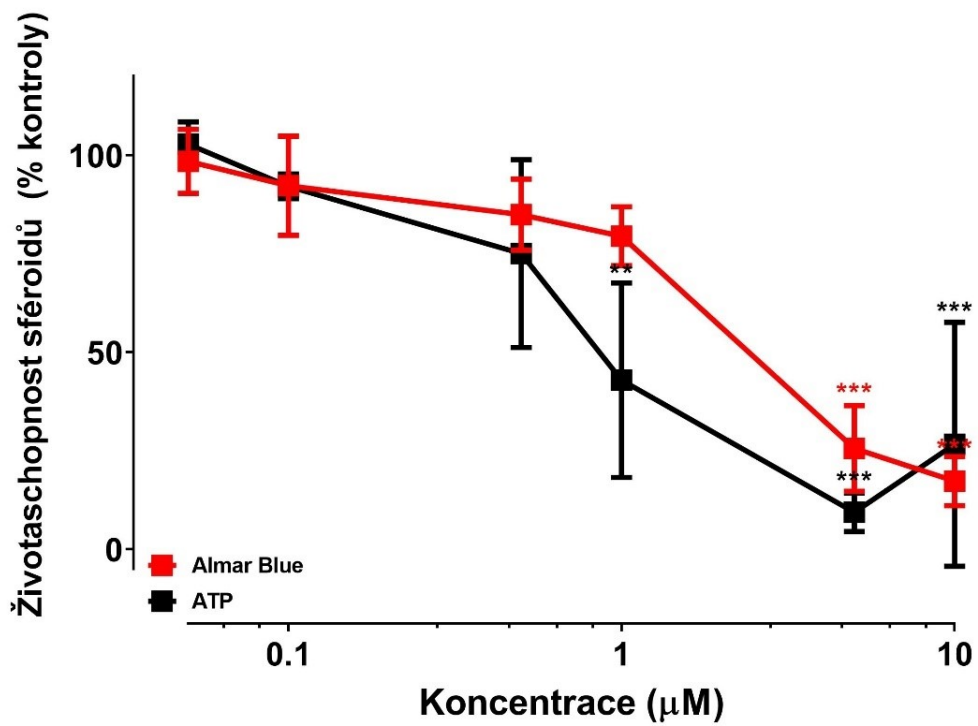
U buněčné linie CT-26 vyhodnocením životaschopnosti metodou AB došlo k nejméně výraznému poklesu u koncentrace 1  $\mu\text{M}$  na 50 %. U vyšších koncentrací došlo k nárůstu hodnot. Koncentrace 5  $\mu\text{M}$  (57 %) a koncentrace 10  $\mu\text{M}$  (78 %). U stanovení aktivity ATP byl nejvyšší pokles životaschopnosti zaznamenán u koncentrace 5  $\mu\text{M}$  na 62 %. U nižších koncentrací se pokles životaschopnosti pohyboval kolem 96 %, u nejvyšší koncentrace došlo k poklesu pouze na 80 %. Je tedy patrné, že vyšší cytotoxicitu se podařilo zaznamenat metodou AB.

U buněčné linie MCF-7 došlo k nejméně výraznému poklesu životaschopnosti u koncentrace 5  $\mu\text{M}$  na 20 % (stanoveno aktivitou ATP). U koncentrace 10  $\mu\text{M}$  ale došlo k nárůstu životaschopnosti na 40 %. U stanovení metodou AB byl výrazný pokles zaznamenán také u koncentrace 5  $\mu\text{M}$  na 38 %, u koncentrace 10  $\mu\text{M}$  došlo k snížení životaschopnosti na 30 %

Cytotoxicita látky ZIP300 vyhodnocená metodami AB a aktivitou ATP je zobrazena u buněčných linií CT-26 na Obrázku 26 a MCF-7 na Obrázku 27.



Obrázek 26 Závislost životaschopnosti buněk CT-26 na koncentraci ZIP300 po ozáření.



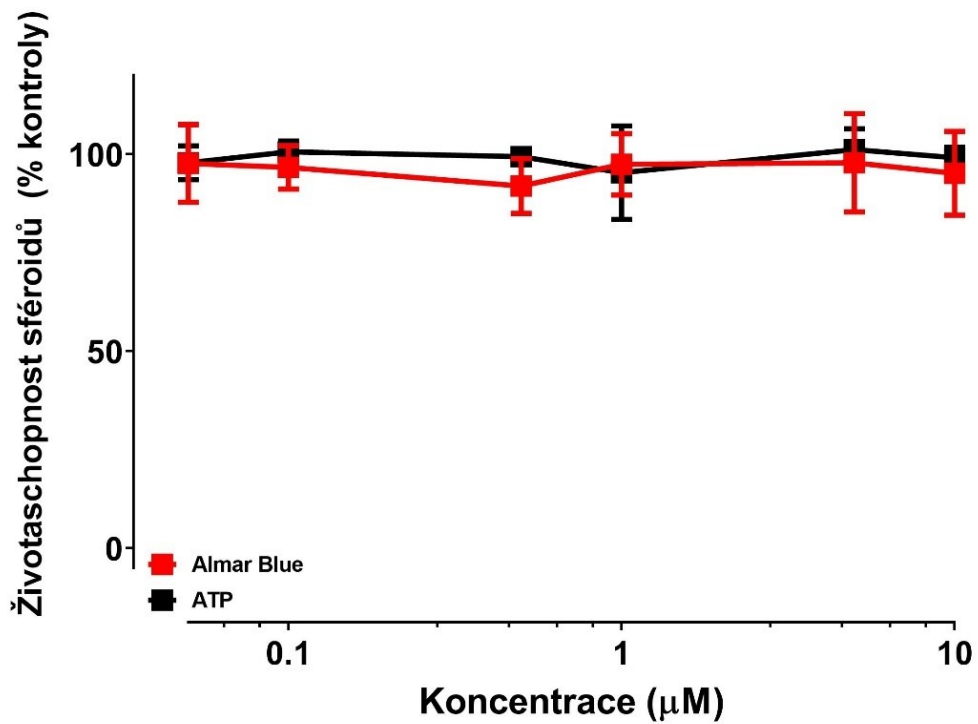
Obrázek 27 Závislost životaschopnosti buněk MCF-7 na koncentraci ZIP300 po ozáření.

#### 6.5.4 PhotoSens<sup>®</sup>

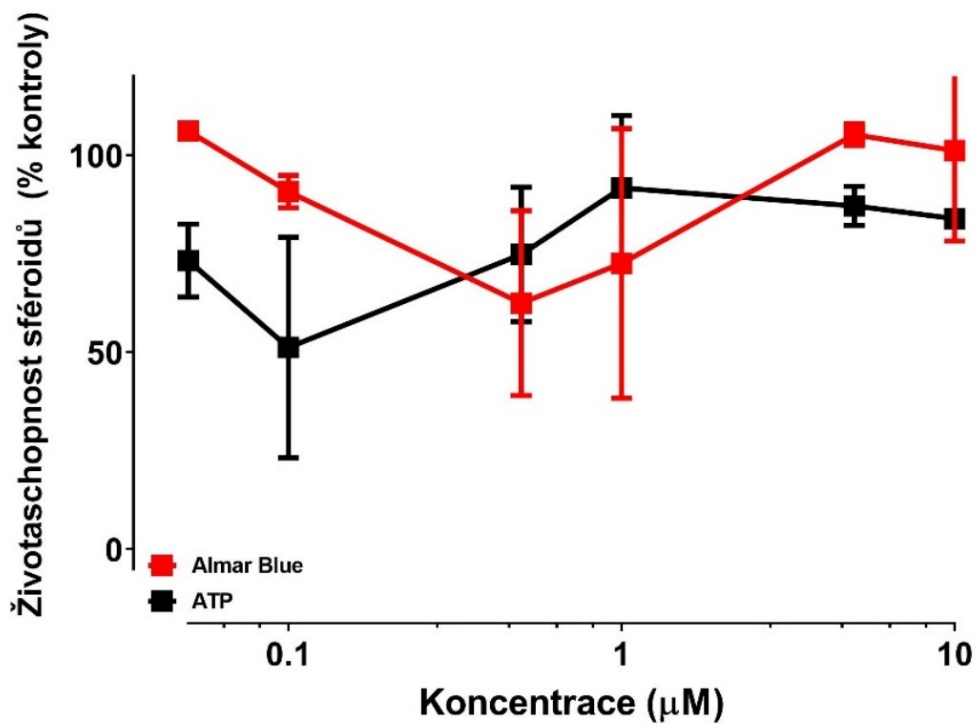
U buněčné linie CT-26 při použití PhotoSens<sup>®</sup> nedošlo téměř k žádnému poklesu životaschopnosti (pokles maximálně na 97 %). Obě metody poskytly téměř stejné výsledky.

U buněčné linie MCF-7 už došlo k výraznějším poklesům životaschopnosti. Pomocí AB jsme vyhodnotili nejnižší životaschopnost u koncentrace 0,5  $\mu\text{M}$  – 62 %. Aktivitou ATP jsme stanovili nejvyšší pokles životaschopnosti u koncentrace 0,1  $\mu\text{M}$  na 19 %. Vyšší koncentrace takto nízkých hodnot nedosahovaly.

Cytotoxicita látky PhotoSens<sup>®</sup> vyhodnocená metodami AB a aktivitou ATP je zobrazena u buněčných linií CT-26 na Obrázku 28 a MCF-7 na Obrázku 29.



Obrázek 28 Závislost životaschopnosti buněk CT-26 na koncentraci PhotoSens® po ozáření.



Obrázek 29 Závislost životaschopnosti buněk MCF-7 na koncentraci PhotoSens® po ozáření.

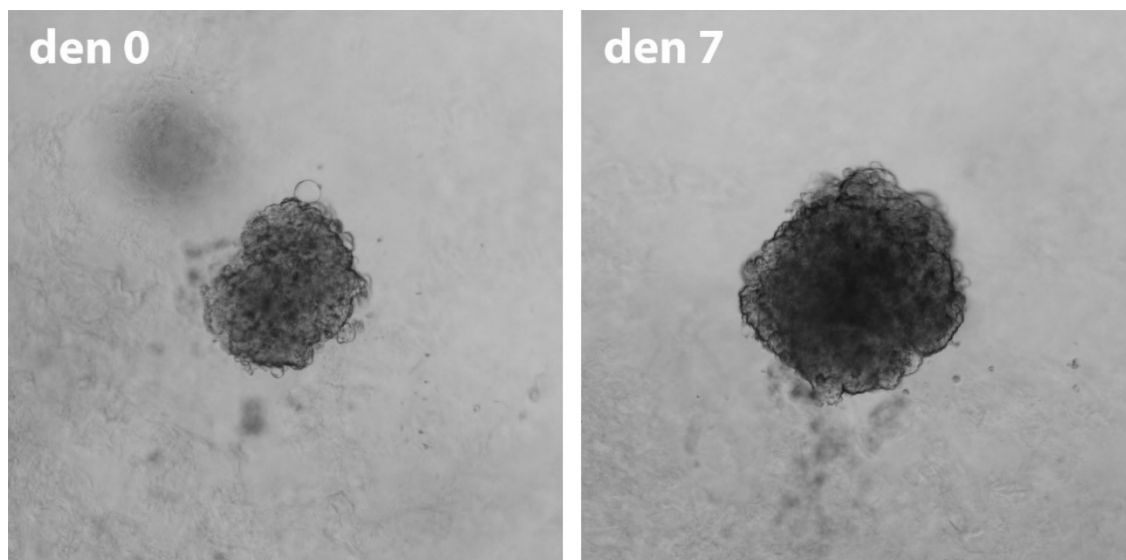
## 6.6 Invazivita sféroidů

Sféroidy z obou buněčných linií byly vytvořeny metodou ULA destičky s počáteční koncentrací buněk 500 buněk/jamku. Experiment byl prováděn 7. den inkubace sféroidů.

Pro zjištění, jestli mají sféroidy invazivní potenciál, jsme sféroidy zalili do Geltrex™, které napodobovalo ECM. Takto připravené kultury jsme sledovali po dobu 7 dnů.

Buněčná linie CT-26 vykázala schopnost invazivity. Již první den po zalití do Geltrexu™ jsme pozorovali začínající tvorbu „paprsků“. 4. den už byly paprsky dobře prorostlé do ECM po celém obvodu sféroidů a kultura tak začínala mít tvar, který je v angl. odborné literatuře označován jako „sunburst“. Negativní kontrolou byly použity sféroidy v SCM, u kterých k vytvoření „paprsků“ nedocházelo.

MCF-7 sféroidy nevykazovaly invazivní charakter, a proto nebyly dále studovány (Obrázek 30). Pozorovali jsme ale, že sféroidy i po 7. dni kultivace vypadali kompaktně a udrželi si pravidelnější tvar oproti kultivaci pouze v SCM médiu – viz Obrázek 20.



**Obrázek 30** Invazivita sféroidů buněčné linie MCF-7.

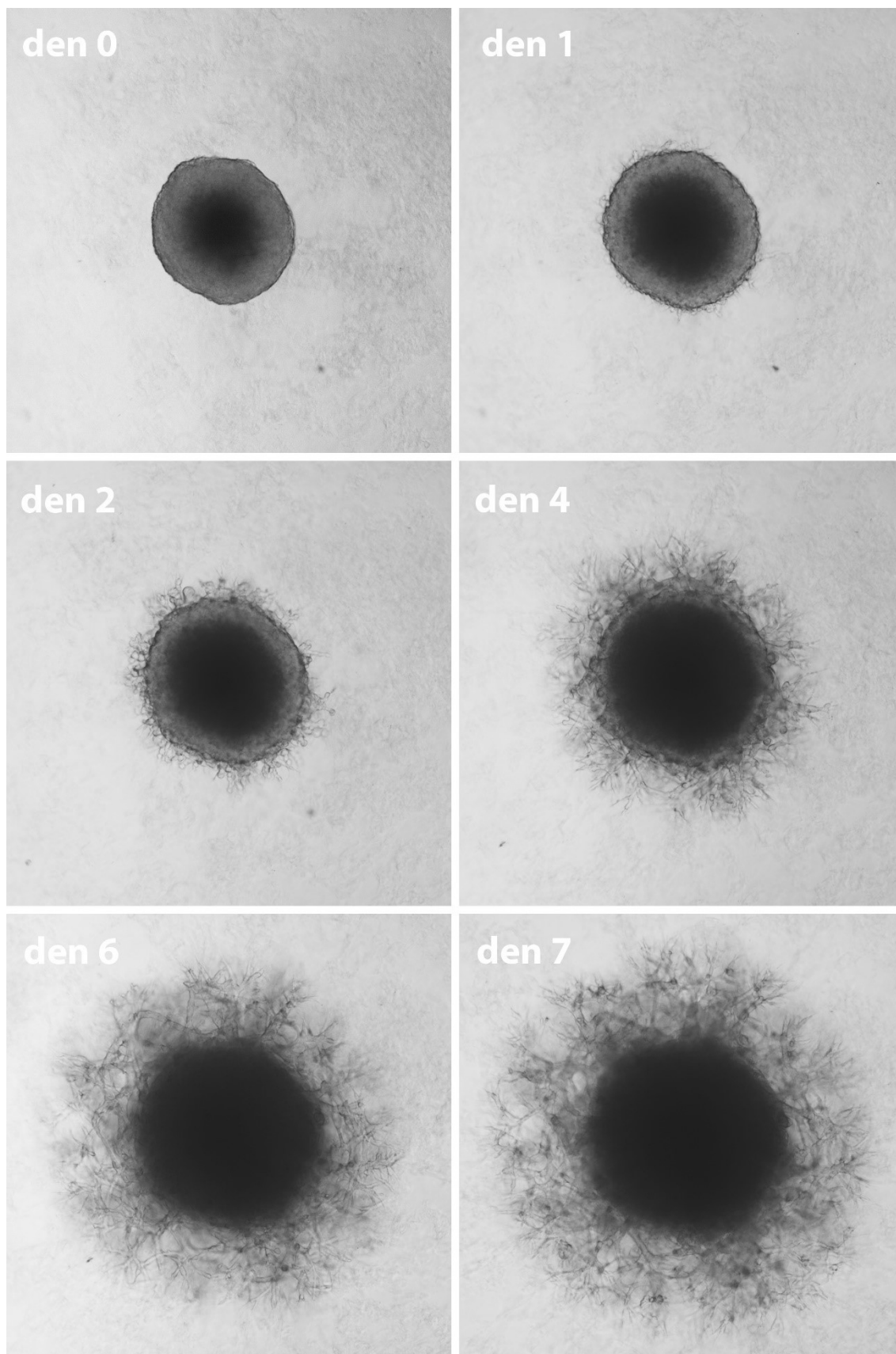
### 6.6.1 Invazivita CT-26 sféroidů po PDT

K 7 dní starým sféroidům jsme přidali studované PSs v jejich nejúčinnějších koncentracích (P40 – 0,5 a 1  $\mu\text{M}$ , P44 – 1 a 5  $\mu\text{M}$ , ZIP300 – 1 a 5  $\mu\text{M}$ , PhotoSens – 1 a 5  $\mu\text{M}$ ) a nechali je inkubovat do druhého dne (12 h), kdy jsme sféroidy opláchli od nenavázaných PSs a zalili je do Geltrex<sup>TM</sup> pro napodobení ECM. Takto připravenou kulturu jsme ozařovali Xe lampou 15 minut. Následně jsme sféroidy sledovali DIC mikroskopií při zvětšení 4 $\times$  po dobu 7 dnů. Kontrolní sféroidy byly inkubovány v Geltrexu<sup>TM</sup> bez PS (Obrázek 31).

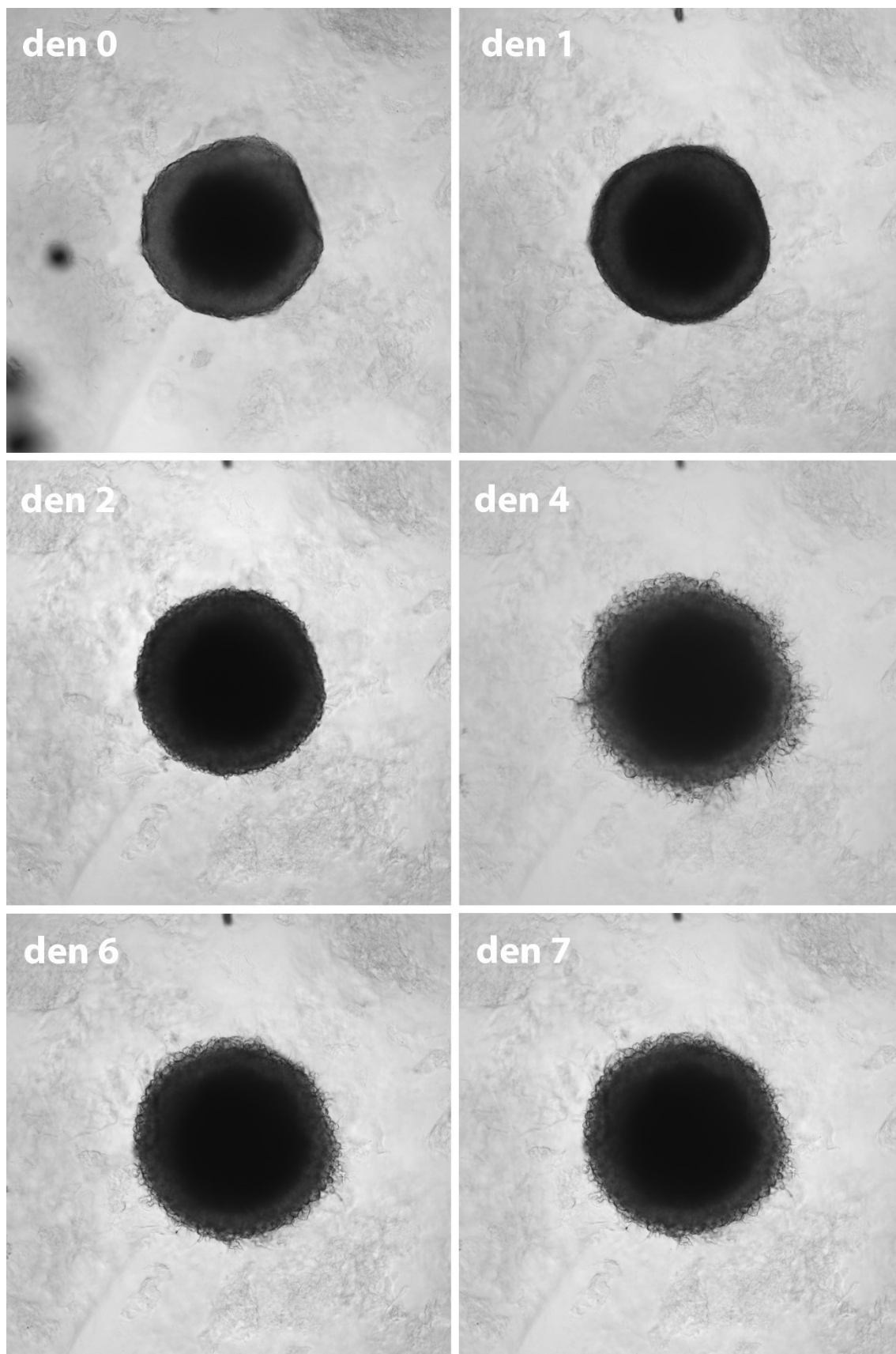
Kontrolní sféroidy 7. den prorostly do ECM do vzdálenosti  $543,8 \pm 40,7 \mu\text{m}$  od povrchu sféroidu. K nejúčinnějšímu snížení prorůstání buněk do ECM po ozáření došlo u sféroidů ovlivněnými látkami P40 (1  $\mu\text{M}$  –  $147,8 \pm 72,8 \mu\text{m}$ ), PhotoSens (5  $\mu\text{M}$  –  $139,6 \pm 20,8 \mu\text{m}$ ) a ZIP300 (5  $\mu\text{M}$  –  $109,7 \pm 20,4 \mu\text{m}$ ). Látka P44 v obou koncentracích dosáhla snížení prorůstání buněk do ECM, ale pouze na hodnotu  $267,2 \pm 55,2 \mu\text{m}$  u koncentrace 5  $\mu\text{M}$ .

Fotografická dokumentace reprezentativních vzorků a grafické znázornění invazivity (vzdálenost, kterou buňky prorostly do ECM od povrchu sféroidu) v závislosti na čase jsou zobrazeny na Obrázcích 31 až 39.

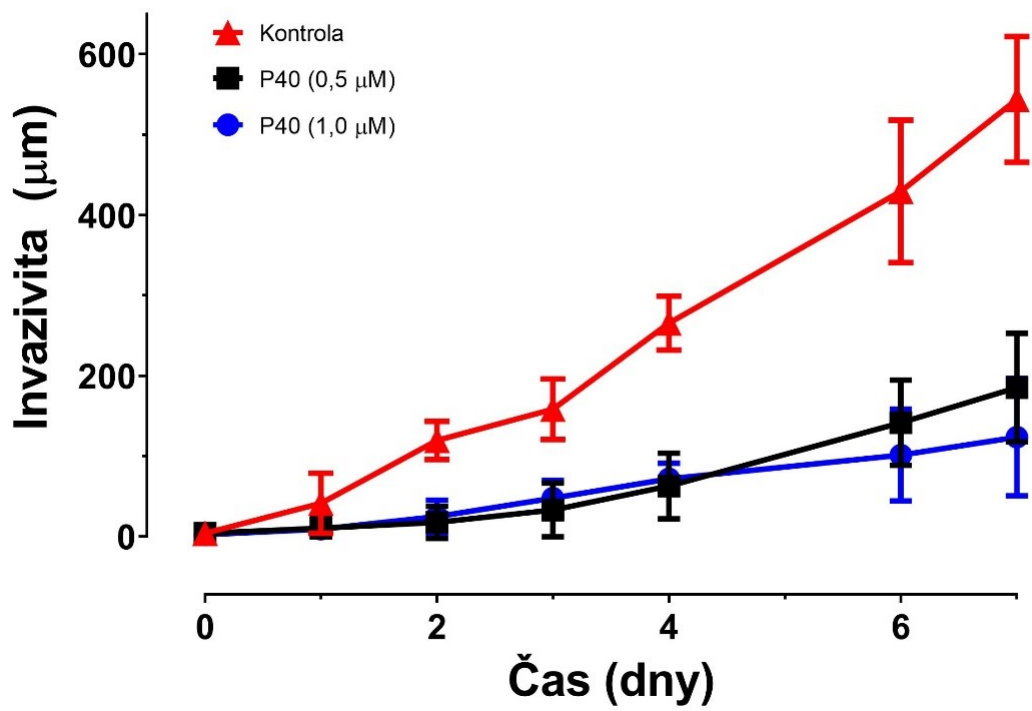




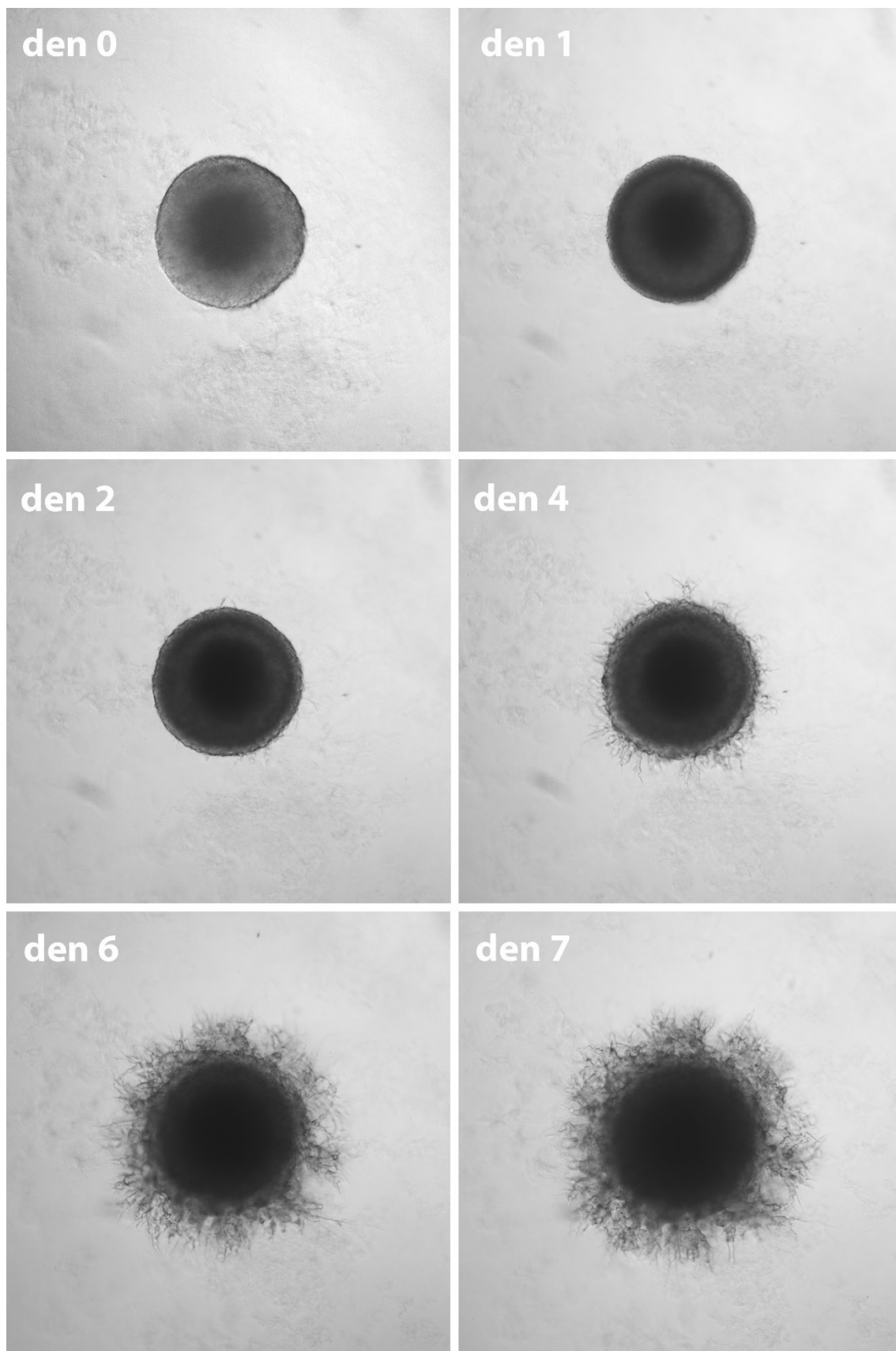
**Obrázek 31** Invazivita sféroidu buněčné linie CT-26 bez ošetření PS – kontrolní sféroidy.



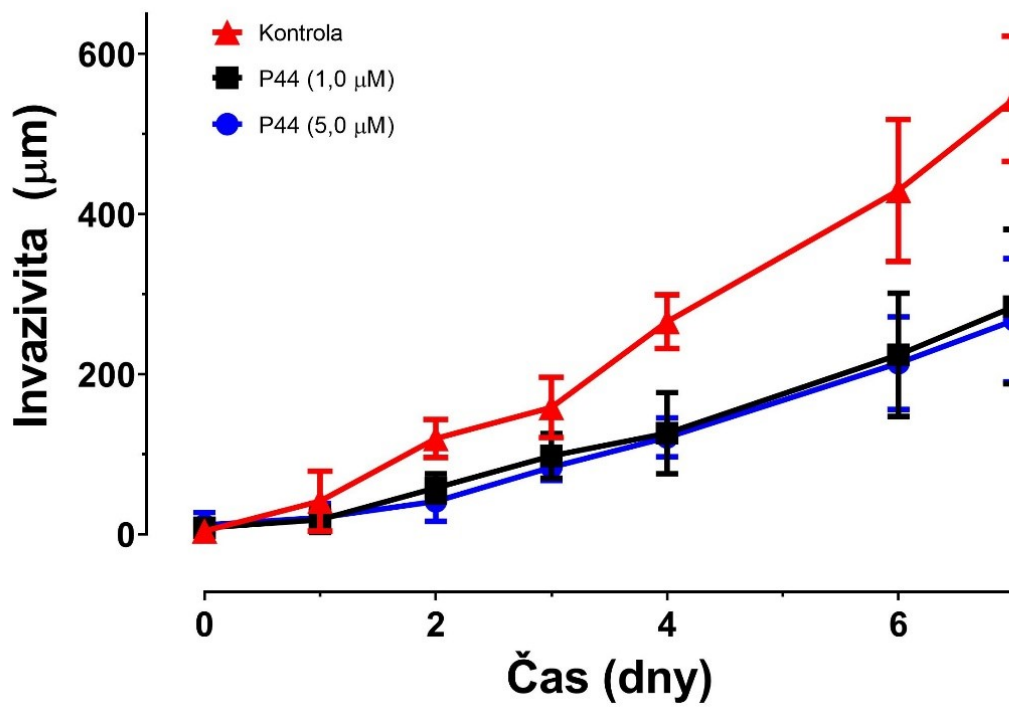
**Obrázek 32** Invazivita sféroidu buněčné linie CT-26 po ozáření s látkou P40 (1,0  $\mu\text{M}$ ).



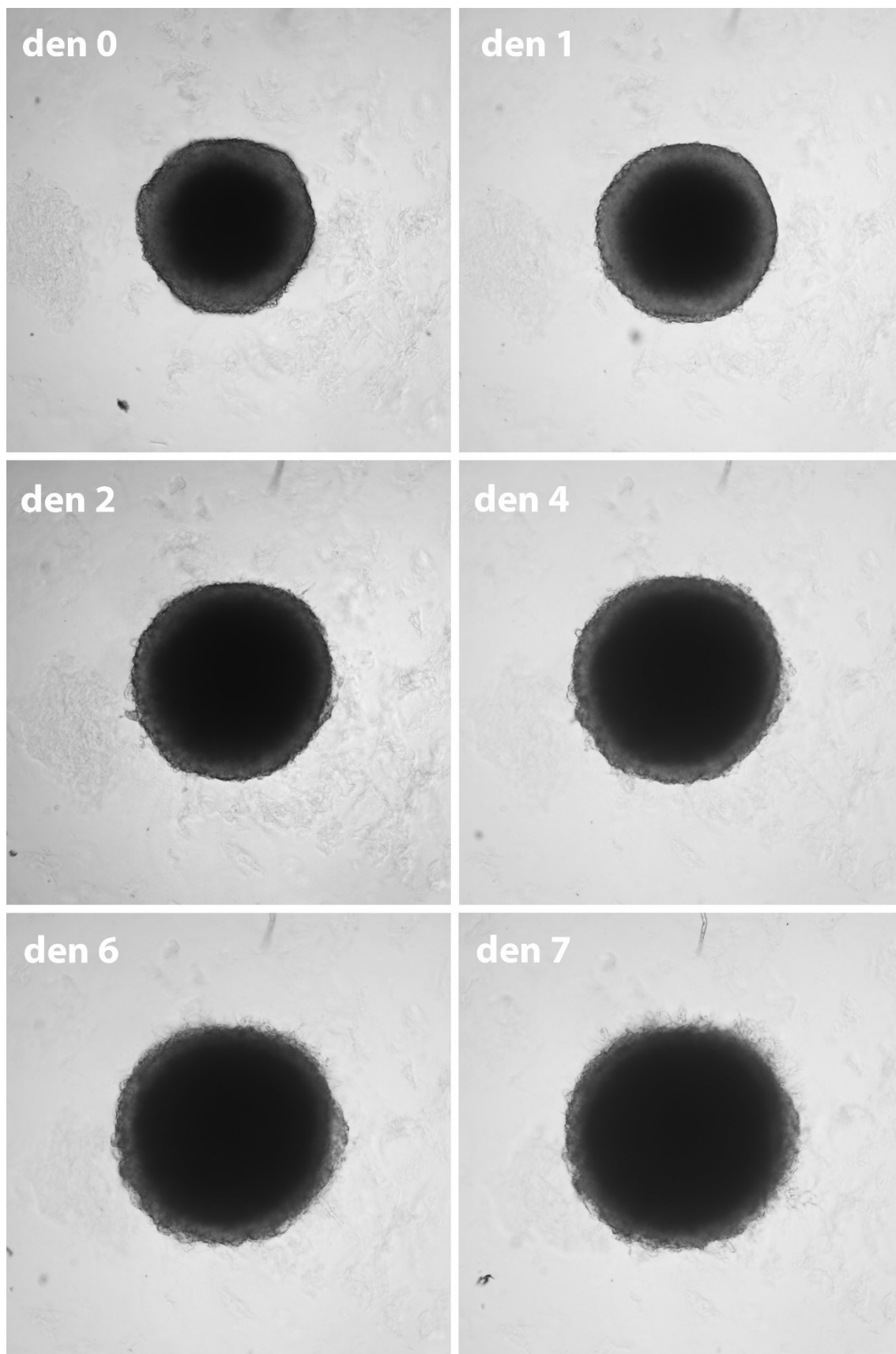
**Obrázek 33** Invazivita sféroidů buněčné linie CT-26 ošetřených látkou P40 a po ozáření.



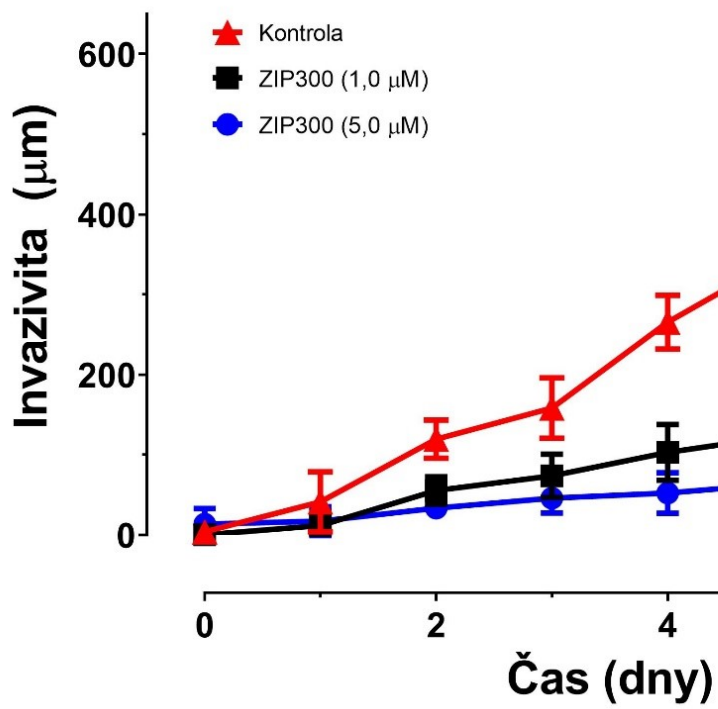
**Obrázek 34** Invazivita sféroidu buněčné linie CT-26 po ozáření s látkou P44 (5  $\mu$ M).



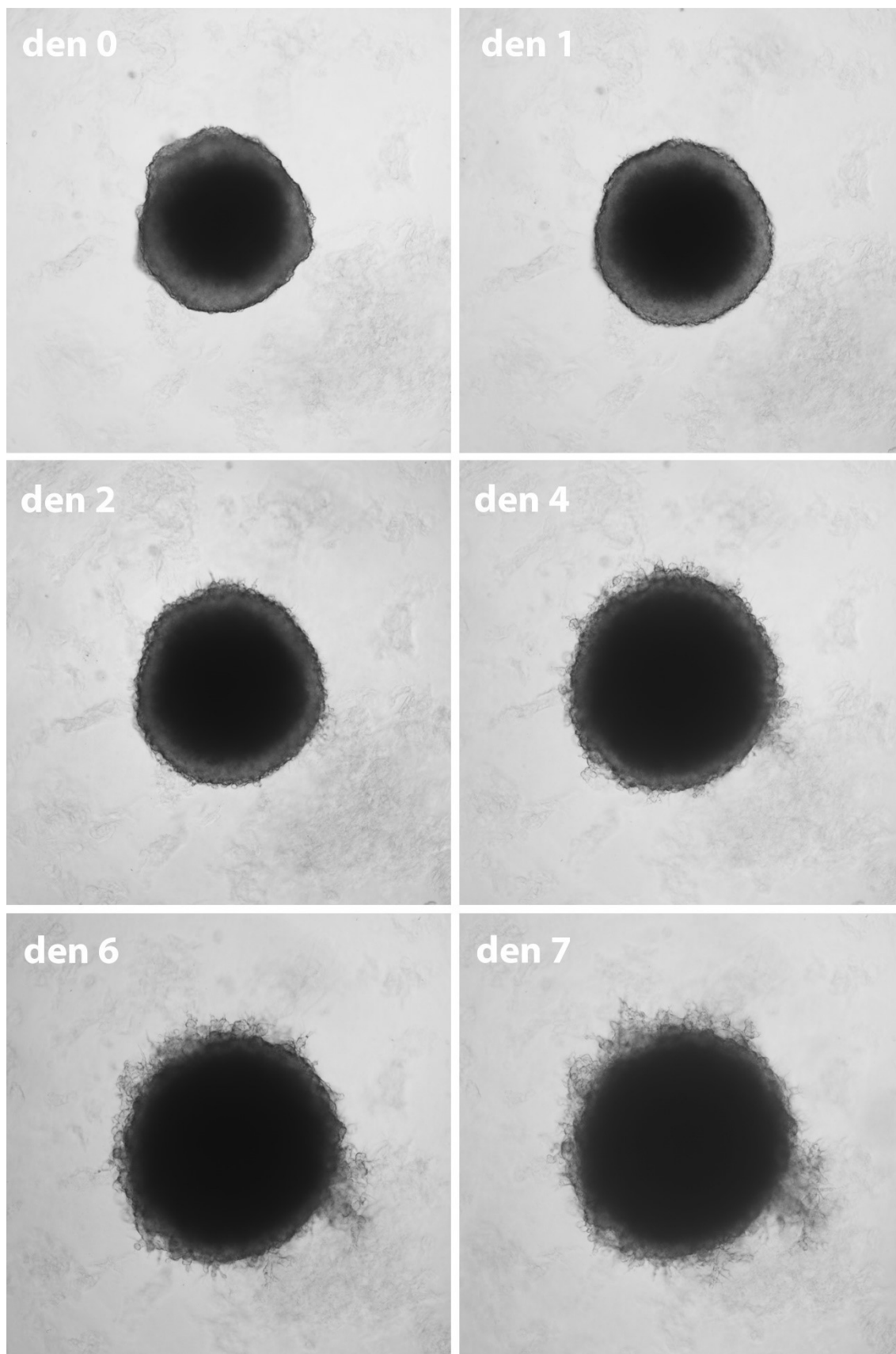
Obrázek 35 Invazivita sféroidů buněčné linie CT-26 ošetřených látkou P44 a po ozáření.



**Obrázek 36** Invazivita sféroidu buněčné linie CT-26 po ozáření s látkou ZIP300 (5  $\mu$ M).

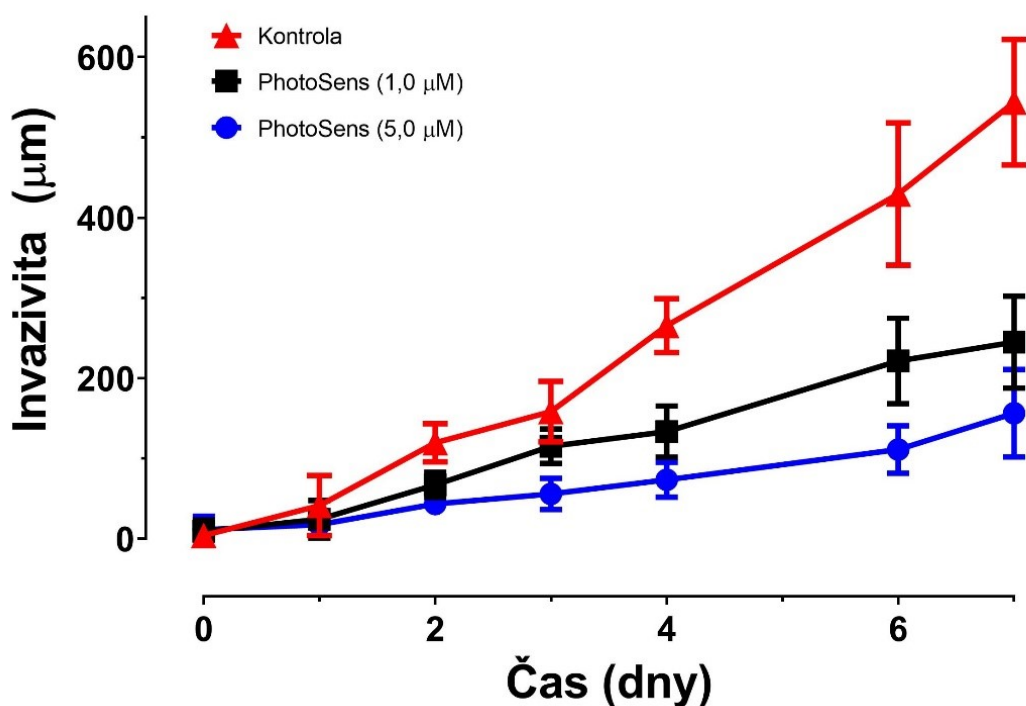


Obrázek 37 Invazivita sféroidů buněčné linie CT-26 ošetřených látkou ZIP300 a po ozáření.



**Obrázek 38** Invazivita sféroidu buněčné linie CT-26 po ozáření s látkou PhotoSens® (5  $\mu$ M).





**Obrázek 39** Invazivita sféroidů buněčné linie CT-26 ošetřených látkou PhotoSens® a po ozáření.

## 6.7 Tkáňové řezy CT-26 sféroidů

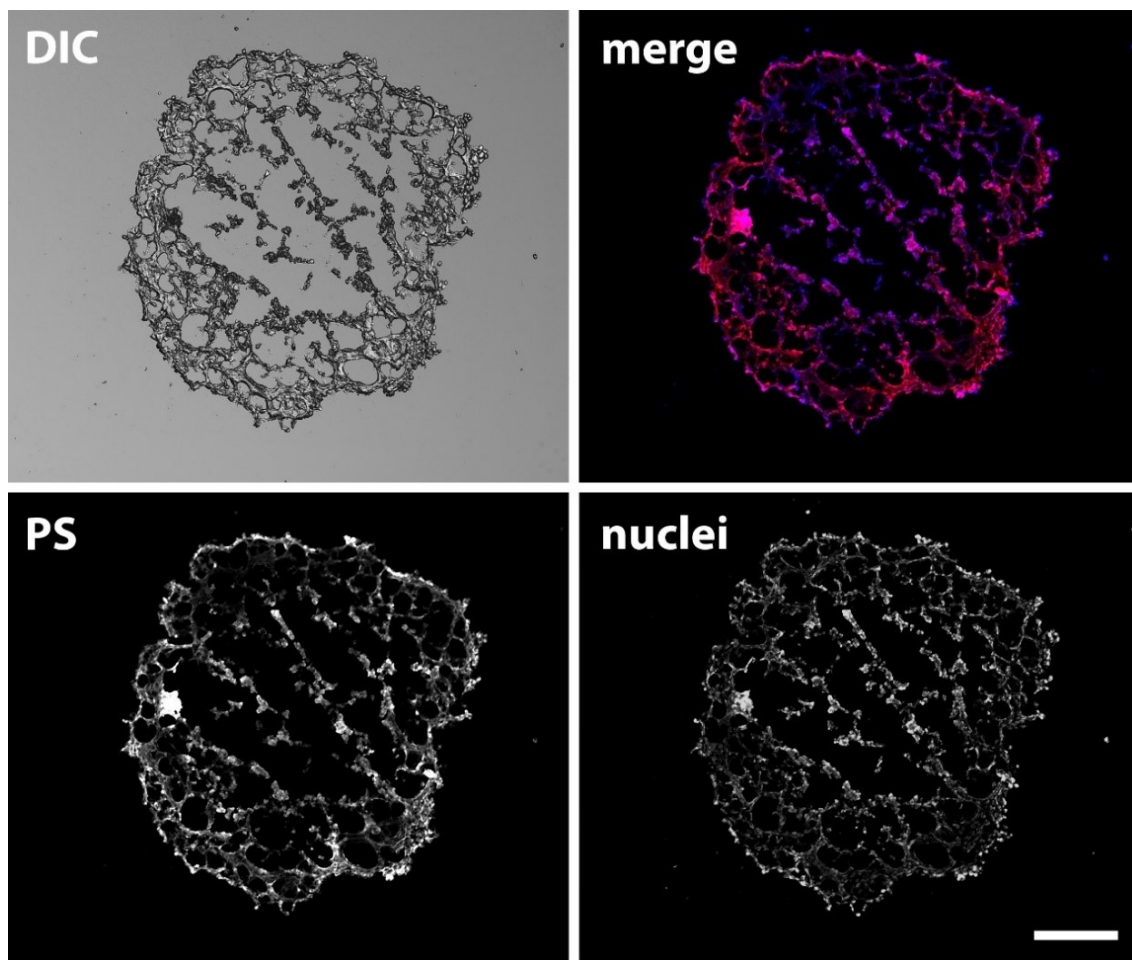
Pro zjištění distribuce PSs ve sféroidech buněčné linie CT-26 byly připraveny 10 μm tlusté tkáňové řezy, z kterých byly vytvořeny preparáty obarvené Hoechst3342 (vizualizace jader). U všech preparátů je patrná odlišná morfologie buněk nekrotického jádra a zbytku sféroиду.

U látky P40 (Obrázek 40) je vidět PS v celém objemu sféroиду s vyšší koncentrací blíže k povrchu. Látka P44 (Obrázek 41) byla detekována pouze v povrchových vrstvách sféroidu. Látka ZIP300 (Obrázek 42) byla detekována především v hypoxickém jádře

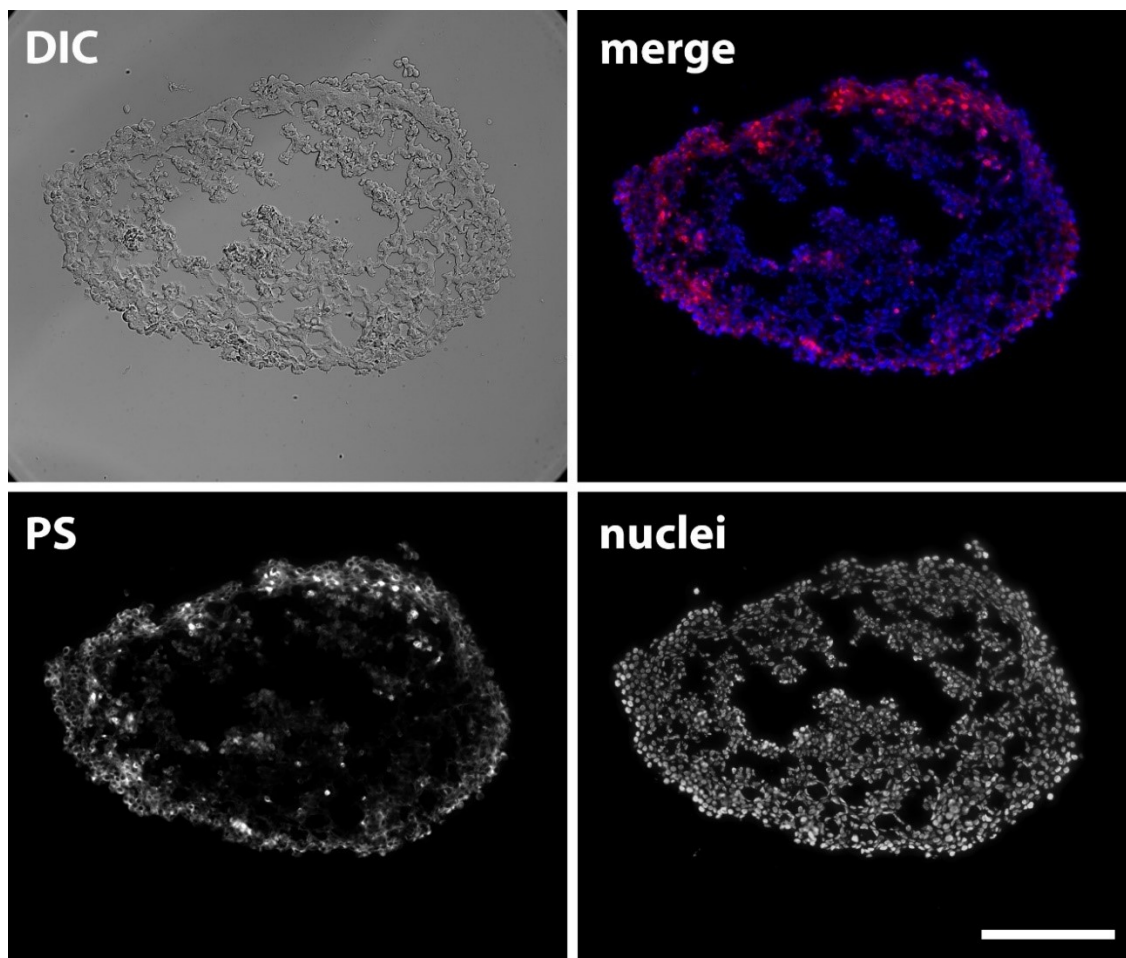
sféroidu. Látku PhotoSens® (Obrázek 43) bylo možné detekovat v celém objemu sféroidu.

Tyto experimenty bude však nutné zopakovat a konfirmovat.

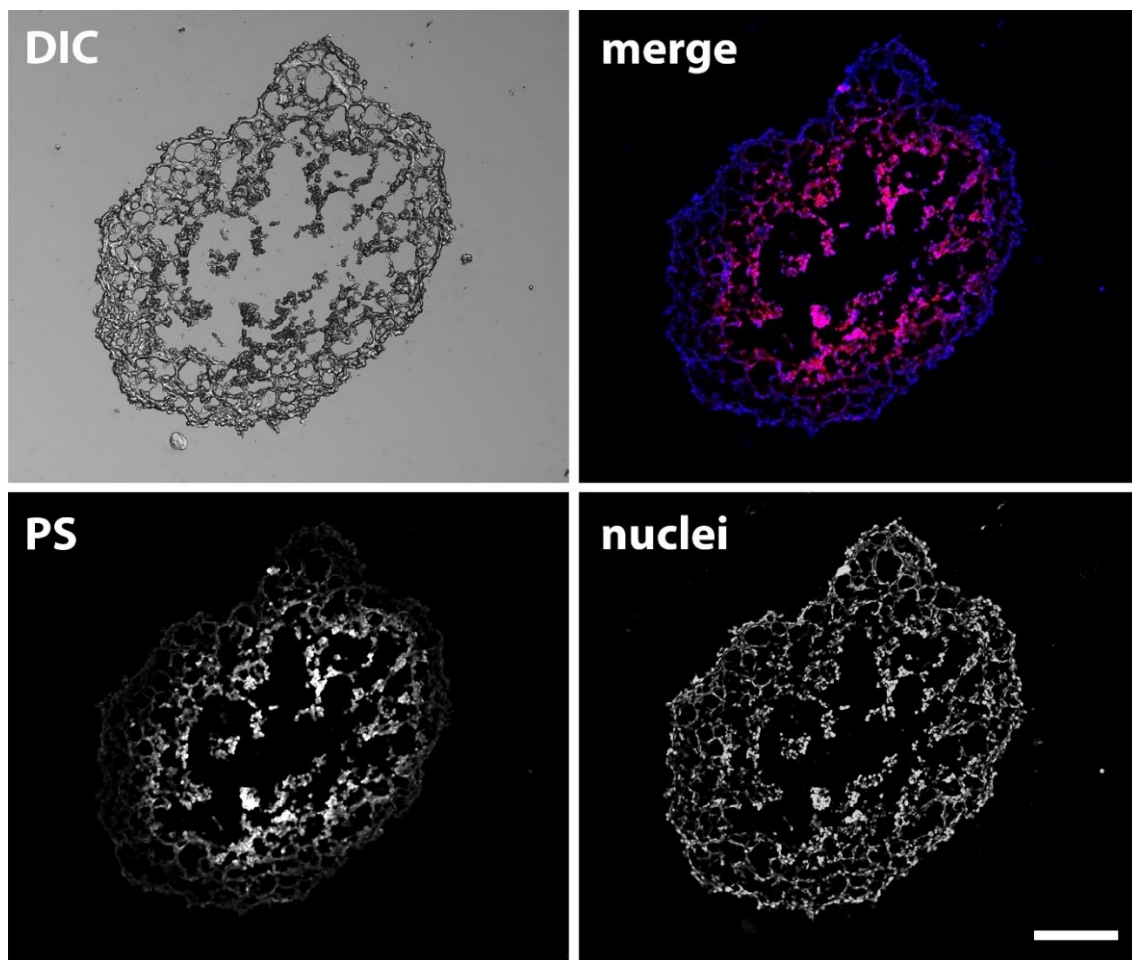
- 1) po fixaci byly sféroidy uchovávaný do dalšího dne v lednici a mohlo tak docházet k redistribuci PS mimo primární lokalizaci. Preparáty tedy bude nutné zamrazit ihned po fixaci.
- 2) Na řezech mají sféroidy houbovitou až síťovitou strukturu, což může být dáno přípravou vzorku – především pak pomalým zamražením v zamrazovacím médiu při -80 °C. Bude nutné optimalizovat metodu fixace, a zároveň zamrazit fixované preparáty pomocí „snap-freezing“ postupu v tekutém dusíku.
- 3) Sféroidy byly inkubované s PS po dobu 24 h (pro větší množství pohlceného PS), zatímco pro cytotoxicitní experimenty pouze 12 h. Bude tedy nutné potvrdit i to, zda tento rozdíl nemá zásadní vliv na distribuci PS ve sféroidech.



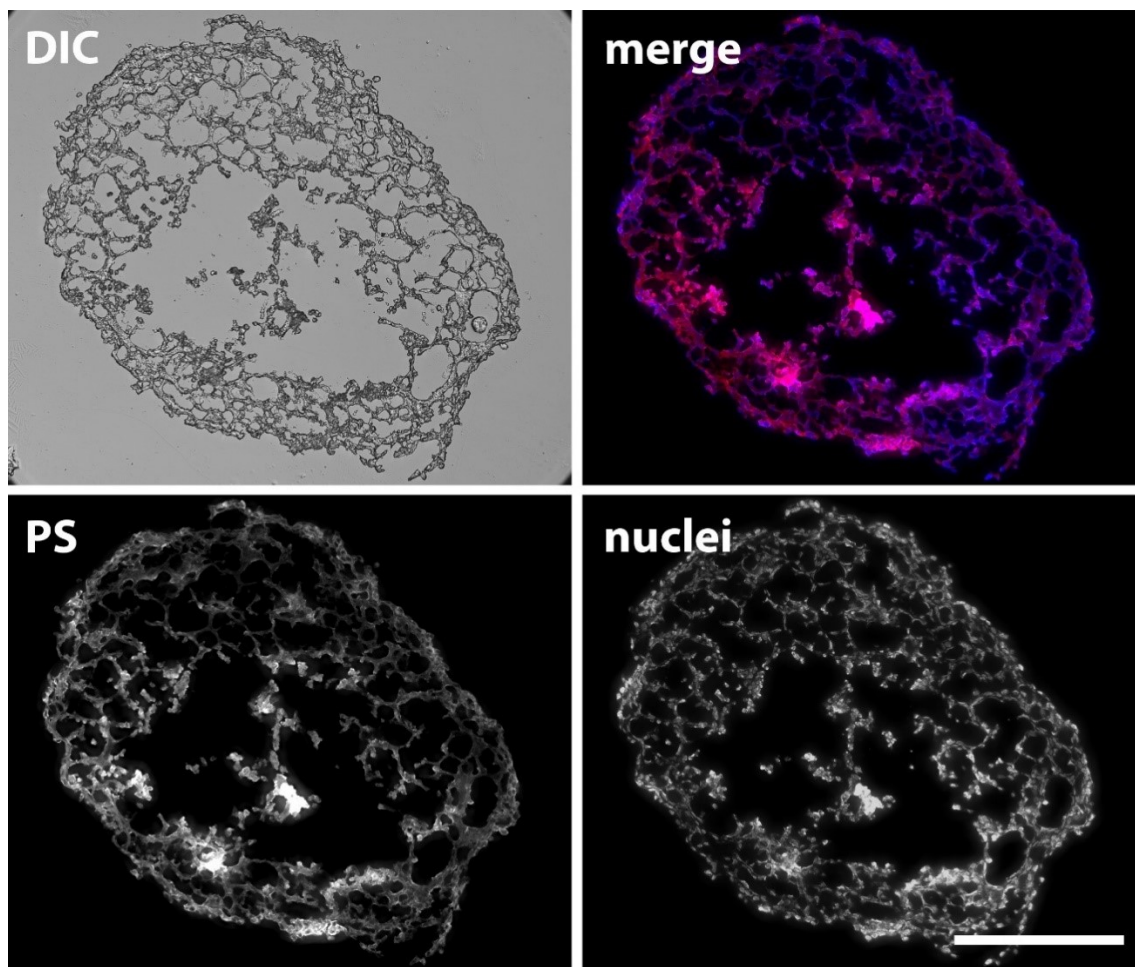
**Obrázek 40** Distribuce látky P40 ve sféroidu buněčné linie CT-26. Měřítko odpovídá 250  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 41** Distribuce látky P44 ve sféroidu buněčné linie CT-26. Měřítko odpovídá 400  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 42** Distribuce látky ZIP30 ve sféroidu buněčné linie CT-26. Měřítko odpovídá 250  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 43** Distribuce látky PhotoSens® ve sféroidu buněčné linie CT-26. Měřítko odpovídá 250  $\mu\text{m}$ .

## 7 ZÁVĚRY

- Vytvořili jsme sféroidy u buněčných linií CT-26 a MCF-7 metodou ULA destičky. Stanovili jsme optimální koncentraci buněk vhodnou pro následující experimenty – 500 buněk/jamku.
- Při sledování růstu sféroidů u obou linií byla podstatná jejich počáteční koncentrace. U obou linií byl pozorován lineární růst sféroidů. Jejich uniformita byla ale rozdílná. Buněčná linie CT-26 poskytovala kompaktnější a pravidelnější sféroidy oproti buněčné linii MCF-7, kde jsme pozorovali ve 7. dnu kultivace částečný rozpad sféroidů.
- Výměna média u buněčné linie CT-26 neměla vliv na růst a uniformitu sféroidů.
- Invazivní chování bylo prokázáno pouze u buněčné linie CT-26. U všech použitých PSs došlo ke snížení invazivity. K nejvýraznějšímu poklesu prorůstání buněk v matrix došlo u látek P40 (1  $\mu$ M), ZIP300 (5  $\mu$ M) a PhotoSens (5  $\mu$ M).
- Nejlepší cytotoxický účinek vykazovala látka P40 u obou buněčných linií.
- Při porovnání dvou metod založených na odlišných principech stanovení životaschopnosti buněk nebyl ve většině případů zaznamenán významný rozdíl.
- Z tkáňových řezů jsme vytvořili preparáty pro konfokální mikroskopii ke zjištění distribuce PSs uvnitř sféroidů buněčné linie CT-26. Látky z různých skupin vykazaly rozdíly v distribuci – tento experiment bude však nutné opakovat a konfirmovat.

## 8 DISKUZE

PDT se ukázala jako účinná fototerapeutická metoda používaná při léčbě nenádorových i neoplastických onemocnění. PDT spočívá v použití světla se specifickou vlnovou délkou selektivní k aktivaci daného PS v přítomnosti  $^3\text{O}_2$ . Aktivace PS vede k tvorbě  $^1\text{O}_2$  nebo jiných ROS. Oxidační stres má potenciál vyvolat buněčnou smrt nebo terapeuticky významnou stresovou reakci. Protinádorové mechanismy PDT mohou zahrnovat přímou smrt nádorových buněk, vaskulární poškození s následnou ischemií nádoru a zvýšenou imunitní odpověď na nádorové antigeny (Lu et al., 2020).

Běžným modelem používaným pro *in vitro* studium PDT jsou 2D buněčné linie vyvinuté z homogenních populací. Výhody použití 2D buněk jsou jednoduchost a spolehlivost, takže jsou jedním ze standardů pro studium nejen PDT. Přesto však existuje určitá „mezera“ mezi 2D modely a *in vivo* nádorem, což může omezovat hodnotu studií PDT *in vitro*. 2D buněčné kultury se liší od solidních nádorů nemožností replikovat komplexnost nádorové architektury a mikroprostředí. To vede k významným rozdílům v přístupu jednotlivých buněk ke kyslíku, přítomnosti hypoxických oblastí, rozdílnou dostupností živin a rozdílnou proliferací. 3D buněčné kultury jsou také významnější v souvislosti s organizací buněk podobně jako *in vivo*, protože je u sféroidů přítomna ECM a mezibuněčné kontakty. Tyhle všechny výhody 3D buněčných kultur by mohly do budoucna přinést lepší možnosti pro testování a vývoj nových léčiv, a mohlo by se tak například opustit od testování na zvířatech. (Till et al., 2016).

V naší práci jsme vytvářeli sféroidy tvořené buňkami z linií CT-26 a MCF-7 metodou ULA destičky. Tato metoda patří k jednoduchým a finančně relativně nenáročným technikám pro tvorbu sféroidů. Vytvořené sféroidy jsme porovnávali z hlediska charakterizace růstu. Zkoumali jsme průměr sféroidů s různými počty buněk na počátku experimentu (50, 250, 500, 1000, 3000) po dobu 14 dnů. Průměr sféroidů obou buněčných linií se lineárně zvětšoval, dynamičtější růst však byl u sféroidů buněčné linie CT-26. V počáteční fázi buňky po centrifugaci agregovaly, v dalších dnech se stával sféroid kompaktnější a kulatější a ideálního tvaru dosáhl během sedmi dnů inkubace.



Sféroidy z buněčné linie MCF-7 sledoval i Zhang *et al.*, 2016. U sféroidů vytvořených metodou visuté kapky s různými koncentracemi buněk pozorovali jejich lineární, ale relativně pomalý růst během 7 dnů inkubace. Kinetiku růstu sféroidů sledoval i Pereira *et al.*, 2017 u buněčných linií HCT-116, MCF-7, MDA-MB-231, UM-UC-3 a HeLa vytvořených v 96-jamkových mikrotitračních destičkách potažených agarosou s koncentrací 2 500 až 20 000 buněk na destičku. Autoři také pozorovali v den nasazení první volné agregáty. U buněčných linií HCT-116, MCF-7, UM-UC-3 a HeLa došlo do 48 hodin k vytvoření kompaktních a rigidních sféroidů a s pravidelným tvarem. Buňky buněčné linie MDA-MB-231 rakoviny prsu zůstaly jako jednotlivé buňky tvořící nestabilní agregáty a nebyly tak vhodné pro další experimenty. Došlo i k potvrzení, že vyšší počáteční hustota buněk vede ke vzniku sféroidů s většími objemy a naopak. Ve studii stanovili jako správnou inkubační dobu vhodnou pro experimenty 48 hodin (průměrná velikost sféroidů 443  $\mu\text{m}$ ) (Pereira *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016).

V naší práci jsme pro experimenty používali dobu formace 7 dní a počáteční koncentraci 500 buněk/jamku. S těmito parametry dojde k tvorbě sféroidů s průměrnou velikostí  $750 \pm 54 \mu\text{m}$  pro linii MCF-7 a  $742 \pm 12 \mu\text{m}$  pro linii CT-26  $\mu\text{M}$ .

Pro všechny experimenty jsme používali sféroidy u obou buněčných linií v 7. den inkubace s koncentrací 500 buněk/jamku. Tyto sféroidy, jak je zmíněno výše, dosahovaly velikostí přes 700  $\mu\text{m}$ . V literatuře se uvádí jako ideální hodnoty 400-600  $\mu\text{m}$ . Do budoucna bude pro další experimenty vhodné studovat také CT-26 sféroidy ve 3. až 4. dni kultivace, kdy se velikost sféroidů pohybovala okolo 400  $\mu\text{m}$ , a tak porovnat, jestli by došlo ke změně v účinnosti PDT. U sféroidů buněčné linie MCF-7 by obdobné experimenty bylo vhodné provést také u sféroidů s počáteční koncentrací 1000 buněk/jamku v 2. až 3. den kultivace a opět porovnat, jestli budou zaznamenány výraznější změny v účinnosti PDT.

Photofrin a hematoporfyrin patří k nejčastěji studovaným PSs jak v experimentálních, tak klinických studiích. Photofrin je FDA schválen pro léčbu některých nádorových onemocnění. Mezi hlavní problémy tohoto PS patří dlouhodobá kožní fotosensibilizace, vysoký stupeň chemické heterogenity a špatná absorpce červeného světla pronikajícího hlouběji do tkáně. Tyto důvody vedly k výzkumu PSs druhé generace, mezi které patří i ftalocyaniny. Ty mají intenzivnější absorpci ve

viditelné červené oblasti, vysokou účinnost při tvorbě  $^1\text{O}_2$  a jejich snadnou modifikaci (Manoto et al., 2017).

Řada vědeckých publikací poukázala na vyšší odolnost sféroidů vůči různým terapeutickým látkám a přístupům oproti buňkám kultivovaným v monovrstvě. Na základě těchto dat jsme se rozhodli sledovat cytotoxicitu nových ftalocyaninových PSs, syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy FaF UK vědeckou skupinou prof. PharmDr. Petra Zimčíka PhD a jednoho komerčně dostupného PS, na sféroidech buněčných linií CT-26 a MCF-7. Látky P40 a P44 jsou amfifilní povahy a látky ZIP300 a PhotoSens® hydrofilní. Zatímco látky P40 a ZIP300 nesou kladný náboj, látky P44 a PhotoSens® mají náboj záporný.

Pro naše experimenty byla používána Xe lampy v kombinaci s vodním a high-pass filtrem jako zdroj záření ( $\lambda > 570$  nm, 12,4 mW/cm<sup>2</sup>, 15 min, 22,4 J/cm<sup>2</sup>). Životaschopnost buněk jsme vyhodnocovali dvěma metodami s rozdílným mechanismem stanovení – AlamarBlue™ (AB) a CellTiter-Glo® (stanovení ATP). AB je běžně používanou a cenově dostupnou látkou pro stanovení životaschopnosti buněk. Během jednotlivých experimentů jsme zjistili, že nedochází k poklesu životaschopnosti buněk s dalším navyšováním koncentrace PS, ale u vyšších koncentrací jsme pozorovali opětovný nárůst životaschopnosti buněk. Proto jsme si vybrali druhou metodu stanovení životaschopnosti buněk založenou na jiném principu pro potvrzení výsledků, a to stanovením ATP. Chtěli jsme zjistit, jestli nám tato metoda poskytne stejné výsledky jako AB anebo získáme úplně odlišné hodnoty.

Nejvyšší cytotoxicita byla stanovena u amfifilní kationické látky P40 pro obě buněčné linie. Pokles životaschopnosti u buněčné linie CT-26 byl nejvyšší u koncentrace 0,5  $\mu\text{M}$  (26 %). U buněčné linie MCF-7 došlo k nejvyššímu poklesu u koncentrace 1  $\mu\text{M}$  (0,3 %). U buněčné linie MCF-7 prokazovala i látka P44 u koncentrace 10  $\mu\text{M}$ , pokles na 1 %. Sféroidy odvozené od buněčné linie MCF-7 tedy vykazovaly vyšší citlivost vůči PS. U všech studovaných PSs byl však zaznamenán opětovný nárůst životaschopnosti buněk u nejvyšších koncentrací. Podobným tématem se zabývala Zuchowska *et al.* 2017. Ve studii sledovali životaschopnost sféroidů nádoru plic A549 a nemaligních MRC-5 po PDT léčbě ALA jako prekurzoru pro vznik PS protoforfyrinu IX. Celý experiment probíhal na mikročipu. Sféroidy byly ošetřeny ALA v různých koncentracích a následně

ozářeny LED lampou ( $\lambda = 640 \text{ nm}$ , dávka energie  $30 \text{ J/cm}^2$ ). Životaschopnost buněk byla vyhodnocena pomocí AlamarBlue™. Bylo zjištěno, že životaschopnost obou typů sféroidů závisela na koncentraci ALA. Životaschopnost sféroidů A549 a MRC-5 pro  $0,75 \text{ mM}$  ALA se rovnala  $85,68 \% \pm 1,65$  a  $95,83 \% \pm 12,21$ . ALA v koncentraci  $9 \text{ mM}$  způsobila nejvyšší pokles životaschopnosti sféroidů, a to o  $52,65 \% \pm 3,97$  (A549) a  $17,10 \% \pm 1,22$  (MRC-5). To naznačuje, že nemaligní sféroidy vykazovaly vyšší odolnost vůči PDT. Sféroidy nádorových buněk byly sice citlivější vůči PDT, ale životaschopnost buněk neklesla pod  $50 \%$  (Zuchowska et al., 2017).

Námi studované látky P40, ZIP300 a P44 byly studovány na 2D buněčných kulturách Kollárem *et al.* 2020. Buněčné kultury MCF-7 byly ozařovány xenonovou výbojkou ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ ,  $11,7 \text{ J/cm}^2$ ) 15 minut. Hodnota  $EC_{50}$  pro látku P40 byla  $0,035 \text{ }\mu\text{M}$ , pro ZIP300  $0,0028 \text{ }\mu\text{M}$  a pro látku P44  $0,453 \text{ }\mu\text{M}$ . Výsledky tedy ukazují, že hydrofilní kationtový PSc (ZIP300) a amfifilní kationtový PSc (P40) jsou více aktivní v porovnání s amfifilním anionickým PSc (P44). V porovnání s aktivitou těchto PSs u sféroidů v naší práci je patrné, že sféroidy jsou více odolné vůči PDT a je potřeba vysokých koncentrací, aby došlo k výraznějšímu poklesu životaschopnosti buněk (Kollar et al., 2020).

Aktivitu látky PhotoSens® a ZIP300 studovali také Machacek *et al.*, 2016. Buněčná linie HeLa byla ozařována 15 minut ( $\lambda > 570 \text{ nm}$ ,  $11,2 \text{ J/cm}^2$ ). Autoři prokázali, že látka ZIP300 byla velmi účinná i na HeLa buňkách ( $EC_{50} = 0,0038 \text{ }\mu\text{M}$ ). PhotoSens® byl oproti látce ZIP300 účinný až při mnohem vyšších koncentracích ( $EC_{50} = 2,07 \text{ }\mu\text{M}$ ). U sféroidů buněčné linie MCF-7 byl PhotoSens® účinný, životaschopnost buněk poklesla na  $19 \%$  ( $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ ), ale u buněčné linie CT-26 nevykazoval žádnou aktivitu (Machacek et al., 2016).

PDT na sféroidech studoval také Wu *et al.*, 2020. Autoři vytvořili 3D buněčný model z nádorových buněk nasofaryngeálního karcinomu metodou visuté kapky a agregací na agarose (obdobná metoda jako s použitím ULA). Sféroidy byly inkubované s různou koncentrací FosPeg® ( $0,001 - 5 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ) po dobu 24 h. Následně došlo k ozáření dávkou  $5-20 \text{ J/cm}^2$  pomocí  $652 \text{ nm}$  laserové diody. Hodnoty  $IC_{50}$  bylo dosaženo při  $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$  při dávce světla  $20 \text{ J/cm}^2$ . Došlo k potvrzení, že FosPeg® u sféroidů není tak účinný jako u 2D buněčných kultur a vyšší koncentrace poskytovaly vyšší procento živých buněk. Autoři poukazují na to, že tento fakt by měl být způsoben rozdílnou

absorpcí a distribucí PS, penetrací světla a gradientu živin a taky obsahem intracelulárního  $^3\text{O}_2$  (Wu et al., 2020).

Aktivitu lipofilního zinečnatého ftalocyaninu Pc9 uzavřeného do polymerních micel studoval na buněčné linii myšního karcinomu tlustého střeva CT-26 Chiarante *et al.*, 2017. Sféroidy byly vytvořeny v 96-jamkové mikrotitrační destičce potažené agarosou s hustotou  $2 \times 10^4$  buněk/destičku. Sféroidy inkubovali s PS a následně ozářili halogenovou lampou s různou dávkou záření (0 - 4,2 J/cm<sup>2</sup>). Po ozáření dávkou 2,8 J/cm<sup>2</sup> byl prokázán významný pokles životaschopnosti (IC<sub>50</sub> 370 ± 11 nM). U vyšší dávky záření byl pozorován nárůst živých buněk. Autoři v této práci využili potenciál lipofilního Pc9 zapouzdřeného do polymerních micel pro eliminaci buněk karcinomu tlustého střeva. Vzhledem k tomu, že špatná rozpustnost Pc9 za fyziologických podmínek koreluje s nízkou biologickou dostupností a snížením fotodynamické účinnosti, byly vybrány jako nosiče polymerní micely, jejichž úkolem bylo zabránění agregace Pc9. Tyto micely jsou bezpečné pro intravenózní podání (Chiarante et al., 2017).

PDT testovanou na sféroidech připravených mikrofluidním systémem potaženým polyHEMA (hydrogel používaný jako neadhezivní povrch pro tvorbu sféroidů) používal Chen *et al.*, 2015. Pro experimenty byly použity buněčné linie karcinomu prsu T47D a MCF-7. Jako PS byla použita 10 μM methylenová modř a sféroidy byly ozařovány různými dávkami červeného LED záření, od 14 s (0,1 J/cm<sup>2</sup>) do 1 hod (43,8 J/cm<sup>2</sup>). Autoři poukázali na fakt, že při nízkých dávkách ozáření přežily téměř všechny buňky, oproti 2D, u kterých i při nižší dávce (7,3 J/cm<sup>2</sup>) poklesla životaschopnost pod 50 % a od dávky 21,9 J/cm<sup>2</sup> byla většina buněk v monovrstvě mrtvá. Zatímco u nejvyšší dávky, 43,8 J/cm<sup>2</sup>, byla stále část buněk stále živá, hlavně uvnitř sféroidů. Rozdílnost také pozorovaly ve vztahu mezi velikostí sféroidů a účinností PDT. Velké sféroidy vykazovaly vyšší rezistenci oproti menším při stejné PDT dávce. Hodnota u malých sféroidů byla IF<sub>50</sub> (poloviční maximální inhibiční dávka ozáření) 9,4 J/cm<sup>2</sup>, u velkých sféroidů IF<sub>50</sub> 17,8 J/cm<sup>2</sup>. Autoři se také rozhodli otestovat účinnost PDT u kokultur s TAF. Ty mají podle literatury zvyšovat rezistenci nádorů k léčbě. Účinnost PDT na velké sféroidy s a bez TAF nevykazovala významný rozdíl (Y. C. Chen et al., 2015).

Mezi důležité vlastnosti nádorů patří i jejich invazivita. Tu jsme se rozhodli studovat u obou buněčných linií. Pro navození prostředí podobné ECM jsme využili

GelTrex™, který jsme přidali ke sféroidům vytvořeným v ULA destičce s koncentrací 500 buněk/jamku. Invazivní schopnost se prokázala pouze u buněčné linie CT-26, kde již za 24 hodin po vytvoření začaly sféroidy projevovat svůj invazivní charakter. Během dalších dnů se vytvářely sféroidy připomínající slunce s paprsky – v anglické odborné literatuře je proto tento útvar označován jako „sunburst“. Buněčná linie MCF-7 nevykázala invazivní charakter, na druhou stranu tyto sféroidy vykazovaly kompaktnější strukturu s vitálnější morfologií v porovnání s MCF-7 sféroidy kultivovanými pouze v SCM.

Studiem invazivity se v roce 2016 zabýval i Castillo *et al.*, 2016. Invazivita byla testována na buněčné linii U87MG. Sféroidy byly vytvořeny třemi různými metodami a byly porovnávány. K napodobení ECM byl využit kolagen. Sféroidy byly hodnoceny každý druhý den po dobu 8 dní. Byl prokázán invazivní charakter sféroidů buněčné linie U87MG vytvořených všemi třemi metodami – metoda visuté kapky, Gravity PLUS (automatizovaný postup metody visuté kapky) a ULA 96jamková mikrotitrační destička (Castillo *et al.*, 2016).

V naší práci jsme se také rozhodli ošetřit sféroidy buněčné linie CT-26 vybranými PSs (P40, P44, ZIP300, PhotoSens®) v různých koncentracích a sledovat, jestli dojde po ozáření (22,4 J/cm<sup>2</sup>) ke snížení jejich invazivity v intervalu 0 až 7 dní. Buňky kontrolních sféroidů byly schopné prorůst skrze okolní ECM do vzdálenosti 543,8 ± 40,7 μm od povrchu sféroidu. Nejvíce účinné snížení invazivity jsme pozorovali u látek P40 (1 μM; 148,7 ± 72,8 μm), ZIP300 (5 μM; 109,7 ± 20,4 μm) a PhotoSens® (5 μM; 139,5 ± 20,8 μm). Překvapivé jsou výsledky látky PhotoSens, která při stanovení cytotoxicity u buněčné linie CT-26 neměla téměř žádný účinek, ale byla schopna výrazně snížit invazivitu sféroidů.

Podobný experiment provedl Etminam *et al.*, 2011 s ALA. Sféroidy lidských gliomových buněk U373 byly inkubovány s ALA a následně ozářeny. Invazivita byla sledována v kolagenu po dobu 3 dnů. Kontrolní sféroidy prorostly do okolní ECM do vzdálenosti 436,6 ± 45,8 μm. Sféroidy ošetřené PDT vykazovaly snížení invazivního chování ve srovnání s kontrolními sféroidy (184,6 ± 16,7 μm). Autoři tedy také potvrdili, že za použití PDT lze snížit invazivitu sféroidů do okolního prostředí napodobující fyziologické ECM (Etminan *et al.*, 2011).

Po zmíněných fotodynamických experimentech jsme se rozhodli pro vytvoření tkáňových řezů ze sféroidů buněčné linie CT-26 za účelem stanovení distribuce studovaných látek v 3D kultuře. Tímto experimentem jsme si chtěli potvrdit naši hypotézu, že studované PSs nepronikají do celého sféroidu, ale pouze do jeho periferních částí, což by mohl být důvod snížení aktivity PSs. Proto jsme sféroidy vytvořené v ULA destičce s koncentrací buněk 3000 buněk/jamku inkubovali 24 hodin se studovanými PSs. Následně byly vytvořeny tkáňové řezy o tloušťce 10  $\mu\text{m}$ . Z tkáňových řezů byly vytvořeny preparáty, a ty byly obarveny Hoechst3342 a zobrazeny fluorescenční mikroskopií. Látka P40 a PhotoSens<sup>®</sup> byly distribuovány v celém objemu sféroidů. ZIP300 byl detekován především v nekrotickém jádře sféroidů. Látka P44 penetrovala pouze do periferních vrstev. Tato zjištění, bohužel, nekorelují s účinkem těchto látek po ozáření a je nutné další studium a opakování těchto experimentů.

Penetraci FosPeg<sup>®</sup> v 3D sféroidech buněk nasofaryngeálního karcinomu sledoval i Wu *et al.*, 2020. Sféroidy byly 24 hodin inkubovány s FosPeg<sup>®</sup> a následně zobrazeny konfokální mikroskopií. Prokázali, že PS byl akumulován hlavně ve vnějším okraji sféroidu. Autoři odkazují i na další studie, kde byla tato hypotéza potvrzena. Například Gaio *et al.*, 2016 provedl a potvrdil hypotézu na sféroidech HeLa buněčné linie (Wu *et al.*, 2020).

## 9 SEZNAM ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
$^3\text{O}_2$	molekulární kyslík
$\cdot\text{OH}$	hydroxylový radikál
$\cdot\text{O}_2^-$	superoxid anion radikál
$\text{CO}_2$	oxid uhličitý
$\text{Ca}^{2+}$	vápenaté ionty
$\text{Mg}^{2+}$	hořečnaté ionty
$\text{NaOH}$	hydroxid sodný
A549	buněčná linie nádoru plic
AB	AlamarBlue™
ALA	kyselina 5-aminolevulinová
APAF1	faktor aktivující apoptosu
ATP	adenosintrifosfát
BAX, BAK	regulátory apoptosy
Bcl-2	geny odvozené od B-buněk lymfomů
BIM, BID	proteiny patřící do rodiny Bcl-2, regulátory apoptosy
CIL	kontaktní inhibice lokomoce
CT-26	buněčná linie myšího kolorektálního karcinomu
Colo699	buněčná linie nemalobuněčného karcinomu plic
CyT49	typ buněčné linie embryonálních kmenových buněk
DIC	diferenciální interferenční kontrast
DMEM	kultivační médium
DNA	deoxynukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EMT	přechod mezi epitelem a mezenchymem
ESC	embryonální kmenová buňka
FU	fluorouracil
GSH	glutathion
$\text{H}_2\text{O}_2$	peroxid vodíku
HeLa	buněčná linie odvozená z lidských buněk karcinomu děložního čípku

hBM-MSC	mezenchymální kmenové buňky odvozené z kostní dřene
HCT-116	buněčná linie rakoviny tlustého střeva
HpD	derivát hematoporfyrinu
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
LED	světlo emitující dioda
Lgr5+	buněčná linie tlustého střeva
MCF-7	buněčná linie lidských buněk karcinomu prsu
MCTS	mnohobuněčné nádorové sféroidy
MDA-MB-231	buněčná linie odvozená od lidského prsního karcinomu
MMP9	matrixová metaloproteinasa 9
MRC-5	fibroblasty vyvinuté z plicní tkáně
MSC	mezenchymální kmenové buňky
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
Pec-01	buněčná linie endodermových pankreatických buněk
PBS	fosfátový pufr
Pc	ftalocyanin
PDAC	buněčná linie duktálního adenokarcinomu pankreatu
PDL	poly-D-lysin hydrobromid
PDMS	polydimethylsiloxan
PDT	fotodynamická terapie
PEG	polyethylenglykol
PHH	primární lidské hepatocyty
Poly-HEMA	polyhydroxymethakrylát
PS	fotozenzitizér
PpIX	protoporfyrin IX
PT45	buněčná linie karcinomu pankreatu
ROS	reaktivní formy kyslíku
SH-SY5Y	buněčná linie používaná jako <i>in vitro</i> model neuronálních funkcí
SCM	DMEM médium obsahující sérum
SOD	superoxid dismutasa
T47D	buněčná linie lidských buněk karcinomu prsu
TAF	fibroblasty asociované s nádorem
TME	mikroprostředí nádoru
ULA destičky	destičky s velmi nízkou adhezivitou



U373	lidská primární glioblastomová buněčná linie
U87MG	lidská primární glioblastomová buněčná linie
UM-UC-3	buněčná linie karcinomu prostaty

## 10 POUŽITÁ LITERATURA

- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347–364.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
- Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., & Reed, M. (2001). The History of Photodetection and Photodynamic Therapy¶. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656.  
[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0656:thopap>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0656:thopap>2.0.co;2)
- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213–1221.  
<https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>
- Bacellar, I. O. L., Tsubone, T. M., Pavani, C., & Baptista, M. S. (2015). Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20523–20559. <https://doi.org/10.3390/ijms160920523>
- Barata, D., Van Blitterswijk, C., & Habibovic, P. (2016). High-throughput screening approaches and combinatorial development of biomaterials using microfluidics. *Acta Biomaterialia*, 34, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.009>
- Bell, C. C., Hendriks, D. F. G., Moro, S. M. L., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A., Fredriksson Puigvert, L., Dankers, A. C. A., Jacobs, F., Snoeys, J., Sison-Young, R. L., Jenkins, R. E., Nordling, Å., Mkrтчian, S., Park, B. K., Kitteringham, N. R., Goldring, C. E. P., Lauschke, V. M., & Ingelman-Sundberg, M. (2016). Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific Reports*, 6(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep25187>

- Bersini, S., Jeon, J. S., Dubini, G., Arrigoni, C., Chung, S., Charest, J. L., Moretti, M., & Kamm, R. D. (2014). A microfluidic 3D invitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials*, *35*(8), 2454–2461.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.050>
- Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., & Miłowska, K. (2020). Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>
- Bolognin, S., Fossépré, M., Qing, X., Jarazo, J., Ščančar, J., Moreno, E. L., Nickels, S. L., Wasner, K., Ouzren, N., Walter, J., Grünwald, A., Glaab, E., Salamanca, L., Fleming, R. M. T., Antony, P. M. A., & Schwamborn, J. C. (2019). 3D Cultures of Parkinson’s Disease-Specific Dopaminergic Neurons for High Content Phenotyping and Drug Testing. *Advanced Science*, *6*(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1002/advs.201800927>
- Brancato, V., Comunanza, V., Imparato, G., Corà, D., Urciuolo, F., Noghero, A., Bussolino, F., & Netti, P. A. (2017). Bioengineered tumoral microtissues recapitulate desmoplastic reaction of pancreatic cancer. *Acta Biomaterialia*, *49*, 152–166. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.072>
- Breslin, S., & O’Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *18*(5–6), 240–249.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *1*(4), 279–293.  
[https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- Castillo, L. R. C., Oancea, A. D., Stüllein, C., & Régnier-Vigouroux, A. (2016). Evaluation of Consistency in Spheroid Invasion Assays. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep28375>
- Cesarz, Z., & Tamama, K. (2016). Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/9176357>

- Chen, L., Xiao, Z., Meng, Y., Zhao, Y., Han, J., Su, G., Chen, B., & Dai, J. (2012). The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials*, *33*(5), 1437–1444. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.056>
- Chen, Y. C., Lou, X., Zhang, Z., Ingram, P., & Yoon, E. (2015). High-Throughput Cancer Cell Sphere Formation for Characterizing the Efficacy of Photo Dynamic Therapy in 3D Cell Cultures. *Scientific Reports*, *5*(July), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep12175>
- Chen, Y. C., Zhang, Z., Fouladdel, S., Deol, Y., Ingram, P. N., McDermott, S. P., Azizi, E., Wicha, M. S., & Yoon, E. (2016). Single cell dual adherent-suspension co-culture micro-environment for studying tumor-stromal interactions with functionally selected cancer stem-like cells. *Lab on a Chip*, *16*(15), 2935–2945. <https://doi.org/10.1039/c6lc00062b>
- Chiarante, N., García Vior, M. C., Awruch, J., Marino, J., & Roguin, L. P. (2017). Phototoxic action of a zinc(II) phthalocyanine encapsulated into poloxamine polymeric micelles in 2D and 3D colon carcinoma cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *170*(Ii), 140–151. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.009>
- Choi, S. H., Kim, Y. H., Quinti, L., Tanzi, R. E., & Kim, D. Y. (2016). 3D culture models of Alzheimer’s disease: A road map to a “cure-in-a-dish.” *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0139-7>
- Chung, M., Ahn, J., Son, K., Kim, S., & Jeon, N. L. (2017). Biomimetic Model of Tumor Microenvironment on Microfluidic Platform. *Advanced Healthcare Materials*, *6*(15), 1–7. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700196>
- Dobson, J., de Queiroz, G. F., & Golding, J. P. (2018). Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. *Veterinary Journal*, *233*, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.11.012>
- Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, *3*(5), 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>

- Donohoe, C., Senge, M. O., Arnaut, L. G., & Gomes-da-Silva, L. C. (2019). Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, *1872*(2), 188308. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.003>
- Dreymueller, D., Theodorou, K., Donners, M., & Ludwig, A. (2017). Fine Tuning Cell Migration by a Disintegrin and Metalloproteinases. *Mediators of Inflammation*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/9621724>
- Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, *32*(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Etminan, N., Peters, C. A., Ficnar, J., Anlasik, S., Bünemann, E., Slotty, P. J., Hänggi, D., Steiger, H. J., Sorg, R. V., & Stummer, W. (2011). Modulation of migratory activity and invasiveness of human glioma spheroids following 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. *Journal of Neurosurgery*, *115*(2), 281–288. <https://doi.org/10.3171/2011.3.JNS10434>
- Fang, Y., & Eglén, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discovery*, *22*(5), 456–472. <https://doi.org/10.1177/1087057117696795>
- Ferreira, L. P., Gaspar, V. M., & Mano, J. F. (2018). Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects. *Acta Biomaterialia*, *75*, 11–34. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.034>
- Foglietta, F., Canaparo, R., Muccioli, G., Terreno, E., & Serpe, L. (2020). Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. *Life Sciences*, *254*(May), 117784. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117784>
- Friedl, P., Sahai, E., Weiss, S., & Yamada, K. M. (2012). New dimensions in cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(11), 743–747. <https://doi.org/10.1038/nrm3459>
- Fuchs, Y., & Steller, H. (2015). Live to die another way: Modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(6), 329–344. <https://doi.org/10.1038/nrm3999>

- Gołab, J., Nowis, D., Skrzycki, M., Czeczot, H., Barańczyk-Kuźma, A., Wilczyński, G. M., Makowski, M., Mróz, P., Kozar, K., Kamiński, R., Jalili, A., Kopec, M., Grzela, T., & Jakóbisiak, M. (2003). Antitumor Effects of Photodynamic Therapy Are Potentiated by 2-Methoxyestradiol. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 407–414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209125200>
- Gupta, N., Liu, J. R., Patel, B., Solomon, D. E., Vaidya, B., & Gupta, V. (2016). Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioengineering & Translational Medicine*, 1(1), 63–81. <https://doi.org/10.1002/btm2.10013>
- Hamalainen-Laanaya, H. K., & Orloff, M. S. (2012). Analysis of cell viability using time-dependent increase in fluorescence intensity. *Analytical Biochemistry*, 429(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.006>
- Henry, E., Cores, J., Hensley, M. T., Anthony, S., Vandergriff, A., de Andrade, J. B. M., Allen, T., Caranasos, T. G., Lobo, L. J., & Cheng, K. (2015). Adult Lung Spheroid Cells Contain Progenitor Cells and Mediate Regeneration in Rodents With Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *STEM CELLS Translational Medicine*, 4(11), 1265–1274. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0062>
- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C., & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010181>
- Huber, J. M., Amann, A., Koeck, S., Lorenz, E., Kelm, J. M., Obexer, P., Zwierzina, H., & Gamerith, G. (2016). Evaluation of assays for drug efficacy in a three-dimensional model of the lung. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(9), 1955–1966. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2198-0>
- Jaganathan, H., Gage, J., Leonard, F., Srinivasan, S., Souza, G. R., Dave, B., & Godin, B. (2014). Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Scientific Reports*, 4, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep06468>
- Kessel, D. (2004). Photodynamic therapy: From the beginning. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 3–7. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00003-1)

- Kessel, David, & Oleinick, N. L. (2018). Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochemistry and Photobiology*, *94*(2), 213–218. <https://doi.org/10.1111/php.12857>
- Kessel, S., Cribbes, S., Bonasu, S., Rice, W., Qiu, J., & Chan, L. L. Y. (2017). Real-time viability and apoptosis kinetic detection method of 3D multicellular tumor spheroids using the Celigo Image Cytometer. *Cytometry Part A*, *91*(9), 883–892. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23143>
- Kollar, J., Machacek, M., Halaskova, M., Lenco, J., Kucera, R., Demuth, J., Rohlickova, M., Hasonova, K., Miletin, M., Novakova, V., & Zimcik, P. (2020). Cationic Versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(14), 7616–7632. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00481>
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *106*(July), 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>
- Langhans, S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(JAN), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Loessner, D., Stok, K. S., Lutolf, M. P., Hutmacher, D. W., Clements, J. A., & Rizzi, S. C. (2010). Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials*, *31*(32), 8494–8506. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.064>
- Lu, S., Lei, X., Ren, H., Zheng, S., Qiang, J., Zhang, Z., Chen, Y., Wei, T., Wang, F., & Chen, X. (2020). PEGylated Dimeric BODIPY Photosensitizers as Nanocarriers for Combined Chemotherapy and Cathepsin B-Activated Photodynamic Therapy in 3D Tumor Spheroids. *ACS Applied Bio Materials*, *3*(6), 3835–3845. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00394>

- Machacek, M., Demuth, J., Cermak, P., Vavreckova, M., Hrubá, L., Jedlickova, A., Kubat, P., Simunek, T., Novakova, V., & Zimcik, P. (2016). Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers. *Journal of Medicinal Chemistry*, *59*(20), 9443–9456. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01140>
- Majety, M., Pradel, L. P., Gies, M., & Ries, C. H. (2015). Fibroblasts influence survival and therapeutic response in a 3D co-culture model. *PLoS ONE*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127948>
- Manoto, S. L., Houreld, N., Hodgkinson, N., & Abrahamse, H. (2017). Modes of Cell Death Induced by Photodynamic Therapy Using Zinc Phthalocyanine in Lung Cancer Cells Grown as a Monolayer and Three-Dimensional Multicellular Spheroids. *Molecules*, *22*(5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050791>
- Martinez De Pinillos Bayona, A., Mroz, P., Thunshelle, C., & Hamblin, M. R. (2017). Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. *Chemical Biology & Drug Design*, *89*(2), 192–206. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12792>
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, *3*(2), 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>
- Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics*, *163*, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>
- Pereira, P. M. R., Berisha, N., Bhupathiraju, N. V. S. D. K., Fernandes, R., Tomé, J. P. C., & Drain, C. M. (2017). Cancer cell spheroids are a better screen for the photodynamic efficiency of glycosylated photosensitizers. *PLoS ONE*, *12*(5), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177737>
- Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F., & Kiesslich, T. (2009). Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*, *24*(2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>



- Ribatti, D. (2017). A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Experimental Cell Research*, 359(1), 17–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.06.012>
- Schulz, T. C. (2015). Enabling Technologies for Cell-Based Clinical Translation  
Concise Review: Manufacturing of Pancreatic Endoderm Cells for Clinical Trials in Type 1 Diabetes. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(8), 927–931.
- Seidel, D., Krinke, D., Jahnke, H. G., Hirche, A., Kloß, D., Mack, T. G. A., Striggow, F., & Robitzki, A. (2012). Induced Tauopathy in a Novel 3D-Culture Model Mediates Neurodegenerative Processes: A Real-Time Study on Biochips. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049150>
- Senthebane, D. A., Rowe, A., Thomford, N. E., Shipanga, H., Munro, D., Al Mazeedi, M. A. M., Almazyadi, H. A. M., Kallmeyer, K., Dandara, C., Pepper, M. S., Parker, M. I., & Dzobo, K. (2017). The role of tumor microenvironment in chemoresistance: To survive, keep your enemies closer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071586>
- Shen, H., Cai, S., Wu, C., Yang, W., Yu, H., & Liu, L. (2021). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture and future development. *Micromachines*, 12(1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/mi12010096>
- Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Reports*, 3(7), 604–609.  
<https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf138>
- Taguchi, A., Kaku, Y., Ohmori, T., Sharmin, S., Ogawa, M., Sasaki, H., & Nishinakamura, R. (2014). Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 14(1), 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.010>
- Till, U., Gibot, L., Vicendo, P., Rols, M. P., Gaucher, M., Violleau, F., & Mingotaud, A. F. (2016). Crosslinked polymeric self-assemblies as an efficient strategy for photodynamic therapy on a 3D cell culture. *RSC Advances*, 6(74), 69984–69998.  
<https://doi.org/10.1039/c6ra09013c>

- Tsai, A.-C., Liu, Y., Yuan, X., & Ma, T. (2015). Compaction, Fusion, and Functional Activation of Three-Dimensional Human Mesenchymal Stem Cell Aggregate. *Tissue Engineering Part A*, 21(9–10), 1705–1719.  
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0314>
- van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn, H. S., Oliveira, S., & Robinson, D. J. (2017). Oncologic photodynamic therapy: Basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cancers9020019>
- Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death and Disease*, 10(3).  
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>
- Wu, R. W. K., Chu, E. S. M., Yuen, J. W. M., & Huang, Z. (2020). Comparative study of FosPeg® photodynamic effect on nasopharyngeal carcinoma cells in 2D and 3D models. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 210(August), 111987. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111987>
- Xu, Y., Shi, T., Xu, A., & Zhang, L. (2016). 3D spheroid culture enhances survival and therapeutic capacities of MSCs injected into ischemic kidney. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(7), 1203–1213. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12651>
- Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Clevers, H., & Watanabe, M. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5 + stem cell. *Nature Medicine*, 18(4), 618–623.  
<https://doi.org/10.1038/nm.2695>
- Zhang, W., Li, C., Baguley, B. C., Zhou, F., Zhou, W., Shaw, J. P., Wang, Z., Wu, Z., & Liu, J. (2016). Optimization of the formation of embedded multicellular spheroids of MCF-7 cells: How to reliably produce a biomimetic 3D model. *Analytical Biochemistry*, 515, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.004>
- Zuchowska, A., Jastrzebska, E., Chudy, M., Dybko, A., & Brzozka, Z. (2017). 3D lung spheroid cultures for evaluation of photodynamic therapy (PDT) procedures in microfluidic Lab-on-a-Chip system. *Analytica Chimica Acta*, 990, 110–120.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.009>