Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: B-MOBIBO

Tadeáš Karel Smetana

Preklinické modely mozkových metastáz

Preclinical models of brain metastases

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Barbora Výmolová

Praha, 2024

Poděkování

Rád bych poděkoval MUDr. Barboře Výmolové za její ochotu, trpělivost, rady a komentáře, které byly velmi důležité pro sepsání této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne: 29.4.2024

Tadeáš Karel Smetana

Abstrakt

Zhoubná onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. Jednou z vážných komplikací těchto onemocnění jsou mozkové metastázy, jejichž incidence narůstá v souvislosti se zlepšením diagnostiky a pokrokem v terapii primárních nádorů. Léčba mozkových metastáz je však komplikována jejich lokalizací a přítomností hematoencefalické bariéry, která ovlivňuje účinnost řady léčiv. Zásadní význam pro lepší pochopení biologických vlastností metastazujících buněk, jejich vztahu k unikátnímu mikroprostředí mozkové tkáně a testování nových terapeutických přístupů mají preklinické modely. Bakalářská práce se zaměřuje na *in vitro* a *in vivo* systémy modelující klíčové aspekty biologie mozkových metastáz a jejich využití při testování nových terapeutických přístupů.

Klíčová slova: nádorová onemocnění, nádorové mikroprostředí, mozkové metastázy, buněčné kultury, 3D *in vitro* modely, *in vivo* modely

Abstract

Malignant diseases are the second most common cause of death in the Czech Republic. One of the serious complications of these diseases are brain metastases, the incidence of which is increasing due to the improvement of diagnostics and advances in the therapy of the primary tumors. However, the treatment of brain metastases is complicated by their localization and the presence of the blood-brain barrier, which affects the efficacy of many drugs. Preclinical models are essential for better understanding of the biological properties of metastasizing cells, their relationship to the unique microenvironment of brain tissue, and for testing new therapeutic approaches. This bachelor thesis focuses on *in vitro* and *in vivo* systems modelling key aspects of brain metastasis biology and their use in testing new therapeutic approaches.

Key words: cancer, cancer microenvironment, brain metastases, cell cultures, 3D *in vitro* models, *in vivo* models

Seznam zkratek

Zkratka	Česky	Anglicky
Akt	Proteinkináza B	Proteinkinase B
ALK	Anaplastická lymfomová kináza	Anaplastic lymphoma kinase
BBB	Hematoencefalická bariéra	Blood brain barrier
BDNF	Od mozku odvozený neurotrofický faktor	Brain-derived neurotrophic factor
BRAF	Gen kódující protein B-Raf	Gene encoding B-Raf protein
CAF	Nádorově asociované fibroblasty	Cancer associated fibroblasts
CD44	Diferenciační skupina 44	Cluster of differentiation group 44
CDX	Xenografty odvozené od buněčných linií	Cell line derived xenogfafts
CHI3L1	Chitináza 3 podobná 1	Chitinase 3-like-1
COL5A1	Řetězec alfa 1 kolagenu typu V	Alpha 1 chain collagen type V
COX2	Cyklooxygenáza 2	Cyclooxygenase 2
CTLA4	Antigen cytotoxických T-lymfocytů 4	Cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4
CXCL12	Chemokinový ligand 12 s C-X-C motivem	Chemokine ligand 12 with C-X-C motive
CXCL16	Chemokinový ligand 16 s C-X-C motivem	Chemokine ligand 16 with C-X-C motive
CXCR4	Chemokinový receptor typu 4	Chemokine receptor type 4
DS	Stupeň substituce	Degree of substitution
ECM	Extracelulární matrix	Extracellular matrix
EGF	Epidermální růstový factor	Epidermal growth factor
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru	Epidermal growth factor receptor
GDNF	Neurotrofický faktor odvozený z gliové buněčné linie	Glial cell-derived neurotrophic factor
GEMM	Myší modely vytvořené genetickým inženýrstvím	Genetically engineered mouse models
GLUT3	Glukózový transportér 3	Glucose transporter type 3
HA	Kyselina hyaluronová	Hyaluronic acid
HBEGF	Heparin-vázající růstový faktor podobný EGF	Heparin-binding growth factor similar to EGF
HER2	Receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2	Human epidermal growth factor receptor 2
HER3	Receptor lidského epidermálního růstového faktoru 3	Human epidermal growth factor receptor 3

INP	Nanočástice jódu	Iodine nanoparticles
ISOCT	Inverzní spektroskopická optická koherentní tomografie	Inverse Spectroscopic Optical Coherence Tomography
KRAS	Gen kódující protein K-Ras	Gene encoding K-Ras protein
MAP3K4	Mitogenem aktivovaná proteinkináza 4	Mitogen-activated protein kinase 4
miR-9	MikroRNA-9	MikroRNA-9
mTOR	Savčí cíl rapamycinu	Mammalian target of rapamycin
NDRG1	N-Myc downstream regulovaný gen 1	N-myc downstream regulated gene 1
NSG myš	NOD scid gamma myš	NOD scid gamma mouse
PARP	Poly-ADP ribóza polymeráza	Poly-ADP ribose polymerase
PCL	Polykaprolakton	Poly(ϵ-caprolactone)
PDC	Kultury odvozené od pacientů	Patient derived cultures
PD-L1	Ligand programované smrti 1	Programmed Cell Death Ligand 1
PDX	Xenografty odvozené od pacientů	Patient derived xenografts
PEGDA	Polyethylen glykol diakrylát	Polyethylene glycol diacrylate
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza	Phosphoinositide 3-kinase
PIK3R1	Regulační podjednotka alfa 1 fosfatidylinositol 3-kinázy	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
PLG	Poly(laktát-ko-glykolidát)	Poly(lactide-co-glycolide)
PLGF	Placentární růstový faktor	Placental growth factor
PSC	Pluripotentní kmenové buňky	Pluripotent stem cells
PTEN	Fosfatáza a homolog tenzinu	Phosphatase and TENsin homolog
Rb1	Retinoblastomový protein 1	Retinoblastoma protein 1
RGD motiv	Motiv arginylglycylaspartátové kyseliny	Arginylglycylaspartic acid motive
SCID myš	Myš s těžkou kombinovanou imunodeficiencí	Severe combined immunodeficient mouse
shRNA	Krátká vlásenková RNA	Short hairpin RNA
ST6GALNAC5	ST6 N-acetylgalaktosaminid α-2,6-sialyltransferáza 5	ST6 N-acetylgalactosaminide α -2,6-sialyltransferase 5
STAT3	Převodník signálu a aktivátor transkripce 3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBCP-1	Translační program karcinomu prsu-1	Translational breast cancer program-1
TEER	Transendoteliální elektrická rezistence	Transendothelial electrical resistance

TrkB	Tropomyosin kinázový receptor B	Tropomyosin receptor kinase B
Trp53	Protein související s transformací 53	Transformation-related protein 53
WBRT	Celomozková radioterapie	Whole brain radiation therapy

Obsah

1 Úvod 1

2 Mozkové metastázy 1

2.1 Incidence a prognóza 1

2.2 Diagnostika mozkových metastáz 1

2.3 Možnosti terapie 2

2.3.1 Radioterapie a radiochirurgie 2

2.3.2 Chirurgická resekce 2

2.3.3 Chemoterapie 3

2.3.4 Symptomatická léčba 3

2.3.5 Nové terapeutické přístupy 3

3 Specifika mozkové tkáně ve vztahu k rozvoji mozkových metastáz 4

3.1 Hematoencefalická bariéra 4

3.2 Buněčné populace mozkové tkáně 5

3.3 Extracelulární matrix mozkové tkáně 6

3.4 Premetastatická nika 6

4 Popis modelových přístupů využívaných k výzkumu mozkových metastáz 7

4.1 Buněčné kultury 7

4.2 3D *in vitro* modely 11

4.2.1 Sferoidy 11

4.2.2 Hydrogely a scaffoldy 13

4.2.3 Tzv. brain slice culture 15

4.2.4 Organoidy 15

4.2.5 Modely simulující hematoencefalickou bariéru 16

4.3 *In vivo* (zvířecí) modely 18

4.3.1 Myš (*Mus musculus*) 19

4.3.2 Dánio pruhované (*Danio rerio*, tzv. zebrafish) 23

4.3.3 Potkan (*Rattus norvegicus*) 23

5 Závěr 23

6 Seznam použité literatury 25

1 Úvod

Mozkové metastázy jsou jednou z nejčastějších komplikací solidních nádorů. Jejich prognóza je však velmi špatná, protože efektivních přístupů, které prodlužují přežití pacientů nebo vedou k jejich úplnému vyléčení, je stále nedostatek. Problematika biologického chování mozkových metastáz, možností jeho ovlivnění a možné prevence jsou stále málo prozkoumány.

Zásadní význam ve výzkumu mozkových metastáz mají preklinické modely, které slouží jako nástroj pro experimenty umožňující lepší pochopení biologických vlastností metastazujících buněk a jejich vztah k mozkovému mikroprostředí. Rovněž slouží k testování efektivity potenciálních nových terapeutických přístupů. Cílem této bakalářské práce je představení spektra dostupných preklinických modelů mozkových metastáz a jejich využití ve výzkumu. Práce v úvodu pokrývá specifické charakteristiky mozkových metastáz z pohledu buněčné a molekulární biologie, které jsou relevantní pro jejich modelování. Hlavní část práce se zabývá charakterizací jednotlivých preklinických modelů, způsoby jejich přípravy a jejich využitím ve výzkumu biologie mozkových metastáz a vývoji potenciálních nových terapeutických přístupů.

2 Mozkové metastázy

2.1 Incidence a prognóza

Mozkové metastázy jsou nejčastější malignitou centrálního nervového systému; jsou asi desetkrát frekventovanější než primární mozkové nádory a jejich incidence je stále na vzestupu, paradoxně i v důsledku efektivnější terapie primárních malignit a tím delšího přežívání onkologických pacientů. Přibližně 25 % pacientů s metastazujícím nádorem vyvine mozkové metastázy; největší riziko jejich vzniku je u melanomu, dále u karcinomu plic a prsu (shrnuto v Ostrom et al., 2018). V České republice není přesná incidence mozkových metastáz známa (shrnuto v Ludmila Hynková et al., 2016). Prognóza pacientů, u kterých byly mozkové metastázy diagnostikovány, je velmi špatná. Průměrná doba přežití pacientů s mozkovými metastázami se liší v závislosti na typu primárního nádoru. Pacienti s karcinomem prsu metastazujícím do mozku přežívají přibližně 16 měsíců (Sperduto et al., 2020), s karcinomem plic 8 měsíců (J. Li et al., 2019) a s melanomem 14 měsíců (Hasanov et al., 2023).

2.2 Diagnostika mozkových metastáz

Mozkové metastázy jsou nejčastěji bezpříznakové (Shindorf et al., 2020), což komplikuje jejich diagnostiku. Ta však zaznamenala významný posun díky pokrokům v zobrazovací technice. V posledních letech se rovněž u vybraných pacientů provádí aktivní screening mozkových metastáz; jedná se o pacienty s karcinomem plic, melanomem ve čtvrtém stadiu, a v některých případech také o pacienty s metastazujícím HER2-pozitivním a triple-negativním karcinomem prsu (Le Rhun et al., 2021).

Cílená vyšetření pro odhalení mozkových metastáz by měla být provedena u všech pacientů s nádorovým onemocněním, kteří vykazují příznaky mozkové patologie (bolest hlavy, epileptické záchvaty, nové neurologické deficity).

Stanovení diagnózy mozkové metastázy je založeno na zobrazovacích metodách, především magnetické rezonanci mozku (Le Rhun et al., 2021). Pro plánování léčby jsou rozhodující počet, lokalizace a velikost mozkových metastáz odhalených pomocí magnetické rezonance (Yoon et al., 2018).

2.3 Možnosti terapie

Volba způsobu terapie u mozkových metastáz je individuální a závisí na mnoha okolnostech, jako je klinický stav pacienta, počet, velikost a lokalizace metastáz a histopatologická diagnóza a pokročilost primárního nádoru. Nejčastěji je však přistupováno k radioterapii a radiochirurgickým modalitám, případně k chirurgické resekci a k chemoterapii.

2.3.1 Radioterapie a radiochirurgie

V léčbě a prevenci mozkových metastáz se využívá řada radioterapeutických modalit: celomozková radioterapie (WBRT), stereotaktická radiochirurgie, profylaktická kraniální iradiace a Gama nůž. Jejich indikace závisí na počtu a velikosti metastatických ložisek a na jejich lokalizaci zejména ve vztahu ke kritickým strukturám mozku (Linskey et al., 2010).

Stereotaktická radiooperace není použitelná pro pacienty, kteří mají velké léze a léze poblíž kritických struktur; v těchto případech se přistupuje k tzv. frakcionované radiooperaci (Fokas et al., 2012). Gama nůž se využívá pro střední nebo velké metastázy (Noda et al., 2023). Je možné ho využít u pacientů, kteří mají méně než 10 metastatických ložisek a celkový objem nádorové tkáně nepřekračuje 15 cm^3 (Serizawa et al., 2010).

Profylaktická kraniální iradiace snižuje incidenci mozkových metastáz u pacientů s malobuněčným karcinomem plic. Rizikem její aplikace je však neurologická toxicita (Farris et al., 2019).

2.3.2 Chirurgická resekce

Chirurgická resekce je využívána jen u části pacientů s mozkovými metastázami; lze ji provést pouze pokud nádor není lokalizován u důležitých mozkových struktur, které by mohl zákrok poškodit (shrnuto v Ewend et al., 2008) a jen když mají pacienti malý počet metastáz. Rovněž by mělo být možné všechny léze větší než 3 cm v průměru odstranit jedním kraniotomickým přístupem (Kalkanis et al., 2010). Chirurgická resekce mozkových metastáz sice prodlužuje přežití, ale někdy nelze odstranit veškerou nádorovou tkáň, a dochází k recidivám. V takových případech je nutná další léčba (C.-H. Lee et al., 2013). Po provedení chirurgické resekce je možné ložisko stereotakticky ozářit. Bylo prokázáno, že tento přístup zvyšuje pravděpodobnost přežití (Mengue et al., 2020).

2.3.3 Chemoterapie

Omezený průnik systémové chemoterapie do mozkové tkáně je faktor, který omezuje její využití u mozkových metastáz. Proto existuje pouze malé množství chemoterapeutik cílících specificky na mozkové metastázy a rovněž využití systémové chemoterapie pro léčbu mozkových metastáz je zatím ve fázi klinických studií (Peters et al., 2017). Pro cílení na mozkové metastázy musí chemoterapeutika obsahovat složku, která jim umožní průnik přes hematoencefalickou bariéru (BBB); byly například použity nanočástice kyseliny oleanové pro dopravu paclitaxelu do mozku (Bao et al., 2020). V současnosti probíhá vývoj chemoterapeutik nové generace, která prochází přes BBB efektivněji (např. taxany třetí generace) (shrnuto v Bailleux et al., 2020).

2.3.4 Symptomatická léčba

Léčivy pro symptomatickou terapii mozkových metastáz jsou především kortikosteroidy, antiepileptika a antikoagulační terapie. Kortikosteroidy (dexametason) ulevují od symptomů spojených se zvýšeným intrakraniálním tlakem a peritumorálním edémem (Ryken et al., 2010). Antiepileptika slouží ke kontrole epileptických záchvatů. U pacientů s mozkovými metastázami karcinomu prsu, kteří podstoupili WBRT, bylo navíc pozorováno, že prodlužují přežití (Reddy et al., 2015). Antikoagulační terapie nepůsobí přímo na symptomy mozkových metastáz, pomáhá ovšem proti komplikacím s nimi spojenými. Využívá se pro prevenci žilní tromboembolie, která je častou komplikací maligních onemocnění. Pacienti, u nichž se vyskytne, přežívají kratší dobu než ti, kteří podstoupí antikoagulační terapii. Aplikace této terapie je limitována velikostí nádoru (metastázy <3 cm), protože u větších metastáz se zvyšuje riziko hemoragie (Alvarado et al., 2012). Otázka, zda antikoagulační terapie zvyšuje riziko intrakraniálního krvácení u pacientů s mozkovými metastázami, nebyla dosud jednoznačně zodpovězena (Horstman et al., 2018).

2.3.5 Nové terapeutické přístupy

Prostupnost většiny léčiv do mozku je omezena přítomností BBB (Park et al., 2012). Jedním ze směrů výzkumu v rámci terapie mozkových metastáz jsou nové přístupy pro překonání této bariéry (Knuutinen et al., 2018). Mezi experimentální přístupy cílené na zvýšení permeability BBB pro léčiva patří soustředěný ultrazvuk kombinovaný s cirkulujícími mikrobublinami, který může dočasně tuto bariéru permeabilizovat (Park et al., 2012). Dalším možným způsobem je hyperosmolární intraarteriální injekce manitolu (Knuutinen et al., 2018). U pacientů s leptomeningeálními metastázami je možné léčiva podat intratékálně, zpravidla lumbální punkcí. Příkladem takového terapeutického přístupu je intratékální aplikace trastuzumabu u mozkových metastáz karcinomu prsu (Bonneau et al., 2018).

Další nově testovanou modalitou v terapii mozkových metastáz je biologická léčba, nicméně její podání je stále ve fázi klinických studií. Ipilimumab (anti-CTLA-4), který podporuje aktivaci T-lymfocytů, jejich proliferaci a infiltraci do nádorů, byl testován u pacientů s mozkovými metastázami melanomu (Queirolo et al., 2014). Využívají se také látky cílící proti PD-1 nebo PDL-1. Terapie cílící

proti PD-1, konkrétně protilátky nivolumab a pembrolizumab, vykazuje efektivitu u mozkových metastáz pocházejících z melanomu (Parakh et al., 2017). U pacientů s mozkovými metastázami nemalobuněčného karcinomu plic je možné kombinovat využití protilátek anti-PDL-1 (dorvalumab) a anti-PD-1 (nivolumab) s radioterapií (Ahmed et al., 2017). Biologická léčba rovněž zahrnuje inhibitory různých enzymů důležitých pro přežití nádorových buněk. Příkladem je veliparib, inhibitor enzymu poly-ADP ribose polymerázy (PARP), který umocňuje protinádorovou aktivitu radioterapie; ten byl testován u pacientů s mozkovými metastázami z nemalobuněčného karcinomu prsu a plic (Mehta et al., 2015). U pacientů s EGFR nebo ALK pozitivním nemalobuněčným karcinomem plic jsou dále využívány inhibitory tyrosin kináz. Bylo testováno, zda radioterapie nezlepší efektivitu tohoto přístupu, ovšem k signifikantnímu zlepšení nedošlo (Thomas et al., 2022).

3 Specifika mozkové tkáně ve vztahu k rozvoji mozkových metastáz

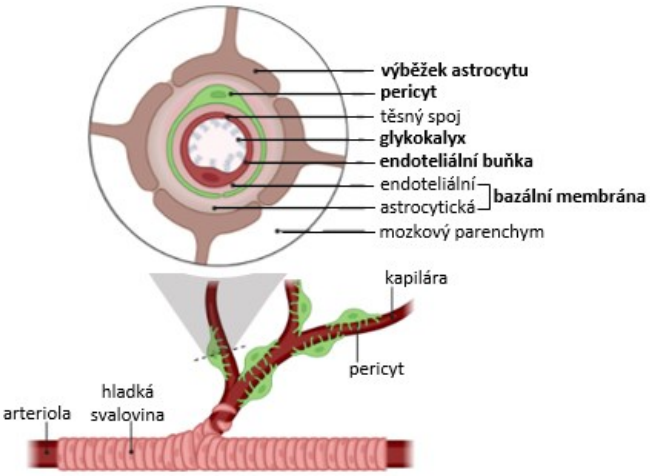
Metastázy vznikají procesem zvaným metastatická kaskáda. Po vycestování z primárního nádoru vstupují nádorové buňky do krevního oběhu procesem intravazace. Buňky, které jsou v krevním oběhu schopné přežít, se dostávají do mozkové mikrocirkulace, kde migrují z cév skrz BBB procesem extravazace a kolonizují mozkovou tkáň (shrnuto v Custódio-Santos et al., 2017). V mozku mohou nádorové buňky buď aktivně vytvořit metastatické ložisko nebo setrvat ve stádiu dormance; právě dormantní nádorové buňky jsou odpovědné za pozdní manifestaci metastáz nebo za jejich relaps (Narkhede et al., 2020).

Mozková tkáň, kterou metastazující buňky při vzniku mozkových metastáz kolonizují, je ve srovnání s jinými tkáněmi v řadě ohledů unikátním prostředím. Její ohraničení BBB určuje prostupnost pro nutrienty, imunitní i nádorové metastazující buňky a v neposlední řadě pro terapeutika. Mozková tkáň navíc obsahuje unikátní buněčné populace, má specifickou strukturu extracelulární matrix (ECM) a specifické imunitní prostředí (Frühauf et al., 2021).

3.1 Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra je vysoce regulované rozhraní mezi krevním oběhem a mozkem. Omezuje vstup škodlivin a infekcí a zajišťuje vstup potřebných nutrientů. Je složena z endoteliálních buněk, bazální membrány pokryté pericyty a na ně nasedajících výběžků astrocytů (shrnuto v Galea, 2021) (Obr. 1). Pericyty aktivně ovlivňují strukturu BBB; bylo prokázáno, že regulují genovou expresi v endoteliálních buňkách (Armulik et al., 2010). Astrocyty téměř kompletně pokrývají stěny cév a mohou tak kontrolovat výměnu vody a iontů mezi krevním oběhem a mozkovým parenchymem (Misje Mathiisen et al., 2010). Byla popsána řada molekul, tvořených jednotlivými buněčnými populacemi BBB, které ovlivňují její strukturu a permeabilitu. Patří mezi ně např. glykokalyx, který je v mozku hustší v porovnání s ostatními orgány a může fungovat jako ochrana endoteliálních buněk (Ando et al., 2018). Dále je důležitý receptor pro neurotrofický faktor odvozený od glií (GDNF) exprimovaný

endoteliálními buňkami, který zvyšuje expresi Claudinu-5. Ten hraje roli v propustnosti BBB modifikací těsných spojů (Shimizu et al., 2012).



Obr. 1: Složení hematoencefalické bariéry (upraveno podle Galea, 2021)

3.2 Buněčné populace mozkové tkáně

Mozková tkáň obsahuje unikátní populace buněk, které mohou různými mechanismy ovlivňovat přežití a růst nádorových buněk metastazujících do mozku. Nejvýznamnější z nich jsou neurony, astrocyty a mikroglie.

Neurony jsou jednou z hlavních složek mozku a nervové soustavy (Herrero-Navarro et al., 2020). Jsou obklopeny hustě organizovanou extracelulární matrix zvanou perineuronální síť (Vo et al., 2013). Recentní práce ukazují, že neurony mohou řadou mechanismů ovlivňovat růst a progresi nádorů metastazujících do mozku. Uvolňují nervové růstové faktory, které působí antiapoptoticky a promitoticky na nádorové buňky (shrnuto v Hoshide & Jandial, 2017). Prorůstový vliv neuronů na metastazující nádorové buňky, mediovaný signalizací prostřednictvím struktur podobných mezerovým spojům (gap junctions), naznačila rovněž práce Savchuk et al. u karcinomu plic (Savchuk et al., 2023).

Astrocyty jsou nejhojnější buňky v mozkové tkáni. Různé subpopulace astrocytů zastávají rozdílné funkce v jednotlivých regionech mozku (Batiuk et al., 2020). V minulosti byl popsán jak nádor-podporující, tak nádor-suprimující vliv astrocytů. V dnešní době ovšem převládají poznatky, že tento vliv je spíše nádor-podporující. Reaktivní astrocyty exprimující fosforylovaný STAT3 mohou podporovat invazi nádorových buněk do mozku prostřednictvím sekrece CHI3L1 (Dankner et al., 2024). Kokultivace buněk karcinomu prsu a karcinomu plic s myšími astrocyty rovněž vedla ke zvýšení exprese genů přežití v nádorových buňkách; bylo tak prokázáno, že astrocyty tímto mechanismem chrání metastatické nádorové buňky před toxicitou chemoterapeutik (Kim et al., 2011).

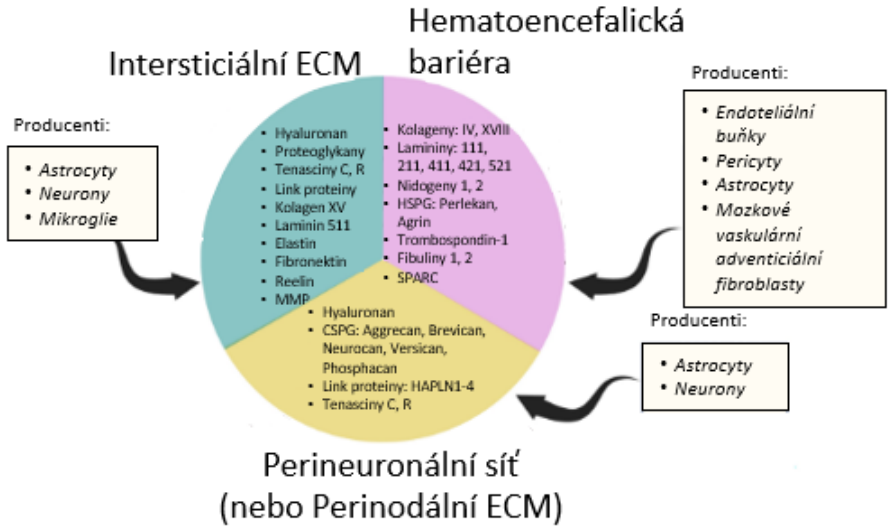
Mezi rezidentní imunitní buňky v mozku patří zejména mikroglie, které jsou důležitou součástí mozkového imunitního systému a podílí se na udržení tkáňové homeostázy. Při poškození mozku jsou

odpovědné za fagocytózu mikroorganismů, mrtvých buněk a proteinových agregátů (Grabert et al., 2016). Bylo prokázáno, že mikroglie produkují chemokiny, které působí chemotakticky na nádorové buňky a také podporují proliferaci nádorových buněk metastazujících do mozku (Hohensee et al., 2017).

V přítomnosti metastázy vstupuje do mozku populace tzv. nádor-infiltrujících lymfocytů (Berghoff et al., 2016). V porovnání s primárními nádory mozku je lymfocytární infiltrát mozkových metastáz početnější (Klemm et al., 2020), nicméně i tak se jedná o imunologicky „studené“ malignity, charakterizované řídkým infiltrátem imunitních buněk a nízkou mírou jejich aktivace (Sobottka et al., 2016).

3.3 Extracelulární matrix mozkové tkáně

Pro mozkovou tkáň je charakteristická její ECM, jejíž komponenty jsou secernovány především neurony a gliálními buňkami. Díky vysokému obsahu vody je řidší než extracelulární matrix jiných orgánů (Frühauf et al., 2021). Nejzastoupenější složkou mozkové ECM je hyaluronan (Jadin et al., 2015). Dále mozková ECM obsahuje nefibrilární složky jako proteoglykany, glykoproteiny, malé tzv. linker proteiny, matricelulární proteiny a enzymy (např. matrixové metaloproteinázy), které regulují její degradaci (shrnuto v Krishnaswamy et al., 2019). Obsahuje téměř zanedbatelné množství kolagenu a dalších fibrilárních proteinů (shrnuto v Zimmermann et al., 2008). Na myších modelech bylo prostřednictvím proteomické analýzy prokázáno, že ECM mozkových metastáz má v porovnání s metastázami v plicích a v kostech výrazně nižší zastoupení proteinů tzv. matrisomu (kolageny, glykoproteiny, proteoglykany) a také různorodější niku s vyšším podílem proteinů asociovaných s matrisomem (např. proteázy, růstové faktory) (Hebert et al., 2020) (Obr. 2).

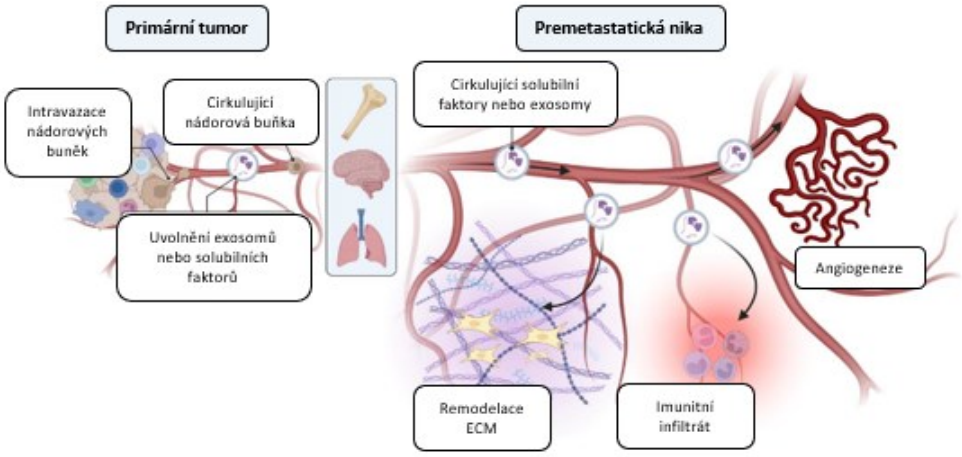


Obr. 2: Složení mozkové ECM (upraveno podle Yuzhalin & Yu, 2023)

3.4 Premetastatická nika

Metastázy se v mozku formují v tzv. premestatické nice, která tvoří podpůrné prostředí pro nádorové buňky (Kaplan et al., 2005). Tvorbu premetastatické niky podporují extracelulární vezikuly,

které putují z primárního nádoru krevním oběhem do místa metastázy a tam ovlivňují mikroprostředí a usnadňují tak usídlení metastazujících buněk (Busatto et al., 2020). Mezi důležité aspekty definující premetastatickou niku patří úprava extracelulární matrix nabohacením proadhezivních faktorů, které způsobují zvýšení adheze nádorových buněk na endotel v místě metastázy. U metastazujících buněk karcinomu prsu k tomuto dochází prostřednictvím E-selektinu. Rovněž je upraveno lokální imunitní prostředí prostřednictvím nádor-infiltrujících lymfocytů (shrnuto v Geissler et al., 2023) (Obr. 3).



Obr. 3: Premetastatická nika (upraveno podle Geissler et al., 2023)

4 Popis modelových přístupů využívaných k výzkumu mozkových metastáz

Mozkové metastázy jsou častou komplikací primárních nádorů, efektivních terapeutických postupů k jejich řešení je však stále nedostatek. Pro výzkum biologie mozkových metastáz a vývoj nových nebo inovaci stávajících možností terapie je zcela zásadní existence preklinických modelů, které co nejlépe simulují chování metastatických buněk samotných a jejich interakce s nádorovým mikroprostředím v mozkovém metastatickém ložisku.

V této části práce jsou popsány jednotlivé modelové přístupy využívané ke studiu biologických vlastností i testování nových terapeutických přístupů u mozkových metastáz. Nejprve jsou shrnuty informace o používaných buněčných kulturách a jejich specifických charakteristikách. Dále jsou uvedeny informace o *in vitro* (3D modely nádorového mikroprostředí, BBB a další) a *in vivo* (zejm. myších) modelech. U jednotlivých modelových systémů jsou popsány jejich vlastnosti, postup přípravy a jsou uvedeny příklady jejich využití. Rovněž jsou zhodnoceny jejich limitace.

4.1 Buněčné kultury

Základním pilířem výzkumu mozkových metastáz jsou kultury nádorových buněk (nádorové buněčné linie). Unikátní charakteristiky mozkových metastáz je potřeba respektovat při volbě nádorových buněčných kultur pro jejich výzkum. Samostatně ovšem nádorové buňky nerekapitulují

celou řadu biologických charakteristik nádorů *in situ*, a tak jsou často inkorporovány do modelů složitějších.

Vznik a progrese mozkových metastáz jsou spojeny s řadou charakteristických změn metastazujících nádorových buněk. Důležité je, že ne všechny nádorové buňky jsou schopné metastazování. Pro metastazování do mozku musí být schopné překonat BBB a následně se musí funkčně adaptovat pro přežití v unikátním prostředí mozkové tkáně.

Byly popsány četné faktory, které usnadňují nádorovým buňkám průnik přes BBB. Zvýšená hladina placentárního růstového faktoru (PLGF), exprimovaná buňkami malobuněčného karcinomu plic, napomáhá jejich migraci přes mozkové endoteliální buňky (B. Li et al., 2013). U karcinomu prsu byly v tomto kontextu popsány cyklooxygenáza 2 (COX2), ligand receptoru heparin-vazebného růstového faktoru podobného EGF (HBEGF) a ST6 N-acetylgalaktosaminid α-2,6-sialyltransferáza 5 (ST6GALNAC5) (Bos et al., 2009). Modely průchodu nádorových buněk přes BBB (viz. kapitola 4.2.5 Modely simulující hematoencefalickou bariéru) byly důležité pro identifikaci proteinů, které jsou pro tento krok metastatické kaskády zásadní.

U buněk metastazujících do mozku se typicky vyskytuje řada mutací, jako např. mutace *BRAF* a *KRAS* (Jacob et al., 2015). U karcinomu prsu a melanomu bylo prokázáno, že do mozku metastazují preferenčně HER2 exprimující buňky (Ilhan-Mutlu et al., 2016). V mozkových metastázách karcinomu prsu byla též detekována pozměněná dráha EGFR/PTEN (Hohensee et al., 2017) a aktivace tropomyosin kinázového receptoru B (TrkB) pomocí z mozku odvozeného neurotrofického faktoru (BDNF) (Contreras-Zárate et al., 2019). V neposlední řadě mají nádorové buňky schopné metastazovat do mozku často mutovaný protein p53, který zabraňuje buňkám podlehnout apoptóze (shrnuto v Valiente et al., 2020).

Příkladem adaptace nádorových buněk, která jim umožňuje lepší přežití a efektivnější proliferaci v mozkové tkáni, je pozměněný energetický metabolismus. Narozdíl od anaerobní glykolýzy, často využívané nádory v hypoxických podmínkách, je u buněk metastazujících do mozku využívána aerobní glykolýza spřažená s trikarboxylovým cyklem a oxidativní fosforylací. V souvislosti s tím bylo také popsáno nabohacení enzymů zajišťujících odbourávání reaktivních forem kyslíku (např. enzymů oxidativní fáze pentózofosfátové dráhy, katalázy a další). Osvětlení pozměněných metabolických drah v mozkových metastázách může poskytnout nové cíle v léčbě těchto malignit (E. I. Chen et al., 2007).

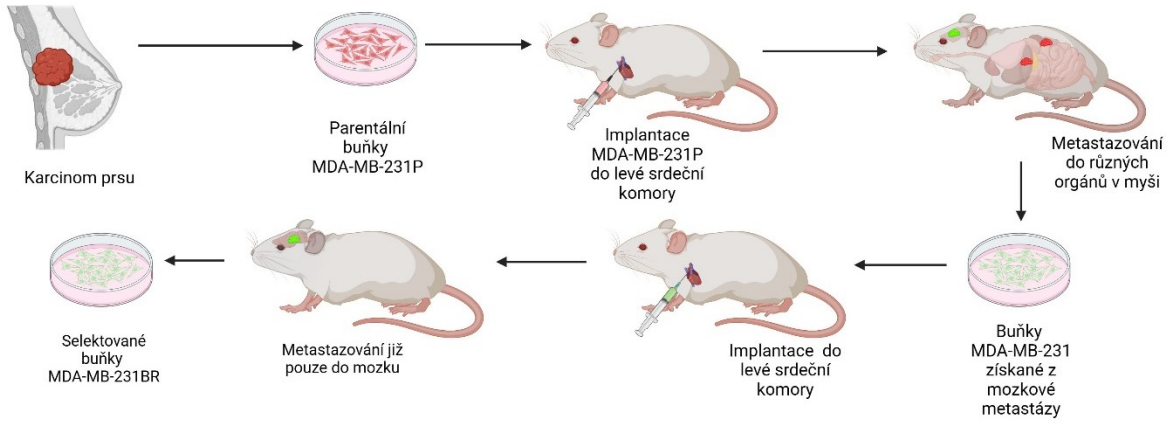
Podobně jako u jiných oblastí onkologického výzkumu jsou ve výzkumu mozkových metastáz využívány komerčně dostupné linie, nebo buňky získané přímo z nádorů (od pacientů odvozené buněčné kultury). Od pacientů odvozené kultury (PDC) lépe vystihují vlastnosti nádorů, ze kterých pocházejí, a navíc je možné získat buňky z různé fáze růstu nádoru a od pacientů různého věku a klinického stavu (Skarkova et al., 2022). Připravují se ze vzorků nádorových tkání vyjmutých během chirurgické resekce nádorů. Existuje řada protokolů pro přípravu PDC, které typicky zahrnují následující kroky: očištění

vzorku od nekrotické tkáně a erytrocytů; rozmělnění mechanicky (rozkrájením) nebo enzymaticky; filtrace přes sítko za účelem vytvoření jednobuněčné suspenze a resuspendování v kultivačním médiu (Krbal et al., 2017). Kromě kultur odvozených z lidské nádorové tkáně lze využívat také kultury odvozené z myších a potkaních nádorů (shrnuto v Valiente et al., 2020).

Buněčné linie, využívané pro studium biologie mozkových metastáz, jsou charakterizovány s využitím genomiky, transkriptomiky a proteomiky. Genomika a transkriptomika odhalily u buněčných linií geny, jejichž mutace jsou časté u buněk metastazujících do mozku (např. *PIK3R1*, *COL5A1*, *MAP3K4* a další) (Saunus et al., 2015). Pomocí proteomického srovnání buněk metastazujících do mozku a buněk primárního nádoru bylo zjištěno, že exprese více než 1000 proteinů se mezi těmito buněčnými populacemi liší; řada z těchto proteinů je u mozkových metastatických buněk spojena s efektivnější migrací do mozkové tkáně a následnou proliferací (Peng et al., 2019; J. Wang et al., 2022). Tato důkladná charakterizace buněk schopných efektivně vytvořit mozkové metastatické ložisko napomáhá určení potenciálních terapeutických cílů v metastatickém procesu (Vare slija et al., 2019).

Komerčně dostupné buněčné linie jsou využívány ve výzkumu mozkových metastáz různého histologického původu, zejména metastáz karcinomu prsu, plic a maligního melanomu, které patří k nejčastějším. Mezi modelové linie pro studium mozkových metastáz karcinomu prsu patří linie MDA-MB-231 a BT474. S využitím těchto linií bylo prokázáno, že v mozkových metastázách karcinomu prsu je navýšen transport a využití glukózy prostřednictvím zvýšené exprese GLUT3. Při vyřazení funkce GLUT3 prostřednictvím shRNA je metabolismus glukózy redukován. Rovněž bylo prokázáno, že buňky s vyřazeným GLUT3 méně migrují a snižuje se jejich malignita. Proto může být GLUT3 možným cílem pro léčbu mozkových metastáz karcinomu prsu (Kuo et al., 2019). Dále byly tyto linie použity ve výzkumu hyperrozvětvených polymerů (dendrimerů) s protilátkou proti HER3 pro specifické cílení nádorových buněk a pH závislé uvolnění doxorubicinu pro selektivní doručení a léčbu mozkových metastáz. Bylo prokázáno, že HER3 cílené hyperrozvětvené polymery s doxorubicinem indukují v buňkách BT474 cytotoxicitu (Lim et al., 2023). Mezi plicní nádorové buňky, které jsou schopné metastazovat do mozku, a jsou tedy vhodné pro studium mozkových metastáz, patří např. linie A549 a PC14-PE6. Buněčná linie plicního adenokarcinomu A549 je jedna z nejvyužívanějších linií ve výzkumu mozkových metastáz. V modelu s A549 bylo například zkoumáno, jak radioterapie ovlivňuje interakci nádorových buněk a mikroglie. Mikroglie secernovaly miR-9, která blokovala mezenchymo-epiteliální tranzici u A549, a tím omezila jejich schopnost kolonizovat mozkovou tkáň (Jin et al., 2021). Příkladem linií využívaných ke studiu mozkových metastáz melanomu jsou linie A2058 nebo WM4237. Na linii A2058 byl proveden výzkum role dráhy PI3K/Akt/mTOR v časné fázi kolonizace mozku. Bylo zjištěno, že časná inhibice PI3K/mTOR způsobuje snížení růstu nádorových buněk a prodloužené přežití myší, na kterých byla inhibice testována (Tehranian et al., 2022) Při využití nádorových buněčných linií je nutno vzít v úvahu, že na jejich vlastnosti má vliv to, v jaké pasáži jsou k experimentům použity. Buňky ve vyšší pasáži mají zhoršenou schopnost migrovat a proliferovat (Cao et al., 2021).

Modelem, který velmi dobře reprezentuje specifické charakteristiky mozkových metastatických buněk, jsou buněčné kultury metastazující preferenčně a cíleně do mozku. Příkladem je tzv. mozek vyhledávající (z angl. brain-seeking) linie karcinomu prsu MDA-MB-231BR odvozená od parentálních buněk MDA-MB-231P. Tyto linie se získávají několikanásobným pasážováním v myším modelu. MDA-MB-231P jsou injikovány do levé srdeční komory, ze které se systémovou cirkulací šíří do různých orgánů včetně mozku. Buňky z mozkových metastáz jsou izolovány a opět injikovány do levé srdeční komory myší. Tento proces se opakuje do doby, kdy nejsou histologicky detekovány žádné mikrometastázy v jiných orgánech než v mozku (Yoneda et al., 2001) (Obr. 4).



Obr. 4: Příprava mozek vyhledávající linie karcinomu prsu MDA-MB-231BR (vytvořeno s využitím softwaru Biorender)

K výzkumu mozkových metastáz jsou hojně využívány geneticky modifikované buněčné linie. Pomocí transfekce nebo transdukce jsou do buněk vkládány cizí nukleové kyseliny (např. plazmidové DNA) za účelem studia genové exprese těchto buněk nebo jejich vizualizace; takové kultury jsou označovány jako reportérové. Příkladem využití transdukce je značení luciferázou, které umožňuje detekci označených buněk *in vivo* metodou bioluminiscence, a dále značení fluorescenčními reportérovými proteiny (Horibe et al., 2014). Metodu transfekce luciferázou využili např. Dragulescu-Andrasi et al. pro detekci aktivace proteáz zapojených do migrace a metastazování nádorových buněk. Použili modifikovaný luciferin (aminoluciferin), substrát luciferázy, který byl štěpen pouze při aktivaci studovaných proteáz (Dragulescu-Andrasi et al., 2009).

Buněčné kultury jsou díky své dostupnosti a snadnému využití jedny z nejrozšířenějších modelů. Lze pomocí nich zkoumat vznik metastáz, růst a další vlastnosti nádorů a také účinnost terapie. Využití samotných buněčných kultur má však četné limitace. Dvourozměrné buněčné kultury nevystihují přesně strukturu tkání a nádorů; buňky v kultuře mají plný a zcela rovnoměrný přístup ke kyslíku a živinám, což neodpovídá situaci *in vivo* (shrnuto v Kolenda et al., 2016). Bez využití různých kokulturních strategií v tomto modelu rovněž schází vliv nádorového stromatu (imunitních buněk,

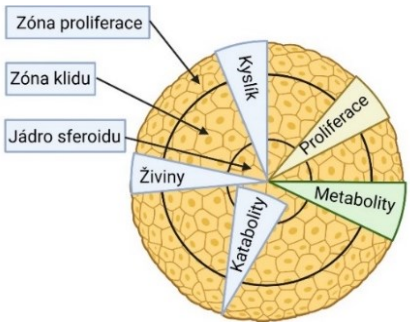
astroglií a dalších). Proto jsou využívány i složitější modely, které lépe reprezentují prostředí mozkové tkáně a chování nádorových buněk v ní.

4.2 3D *in vitro* modely

4.2.1 Sferoidy

Jako sferoidy jsou označovány agregáty nádorových buněk, které se formují v neadhezivních podmínkách. Tyto modely jsou charakteristické mj. specifickým typem růstu, metabolismu, přežití a migrace nádorových buněk. Právě s ohledem na 3D uspořádání, které lépe reprezentuje mezibuněčné interakce i interakce buněk s okolím, jsou sféroidy hojně využívány v onkologickém výzkumu včetně výzkumu biologie mozkových metastáz.

Pro sferoidy je charakteristické jádro (tzv. core), ve kterém mají buňky horší přístup ke kyslíku a živinám, a jádro tak může být až nekrotické. Toto jádro je obklopené buňkami proliferujícími (Nagelkerke et al., 2013). Rychlost vzniku centrální nekrózy závisí na velikosti sferoidů – u sferoidů nad 500 μm se typicky nekrotické jádro vyvine do 5 dnů, u sferoidů do 200 μm se vyvine až po přibližně 8 dnech (Froehlich et al., 2016). Bylo prokázáno, že se ve sferoidech formují 3 zóny, ve kterých buňky migrují a proliferují s rozdílnou rychlostí a intenzitou (Obr. 5). Se vzdáleností od jádra se rovněž snižuje jejich denzita. Toto rozdělení je důležité pro možnou automatizaci vyhodnocování migračních a proliferačních experimentů se sferoidy. V každé zóně mají buňky rozdílnou metabolickou aktivitu, kterou lze stanovit např. pomocí pH indikátoru resazurinu. Čím vyšší je metabolická aktivita buněk, tím více je resazurin redukován, což vede ke změně jeho barvy a změně v měřené absorbanci (Shabalina et al., 2021). V kulturách ve formě sferoidů bylo rovněž detekováno vyšší množství reaktivních kyslíkových radikálů než ve 2D kulturách, což poukazuje na jejich aktivnější metabolismus (Q. Liu et al., 2018). Ve sferoidech však buňky vykazují nižší přežití než ve 2D kulturách (Ivascu et al., 2006).

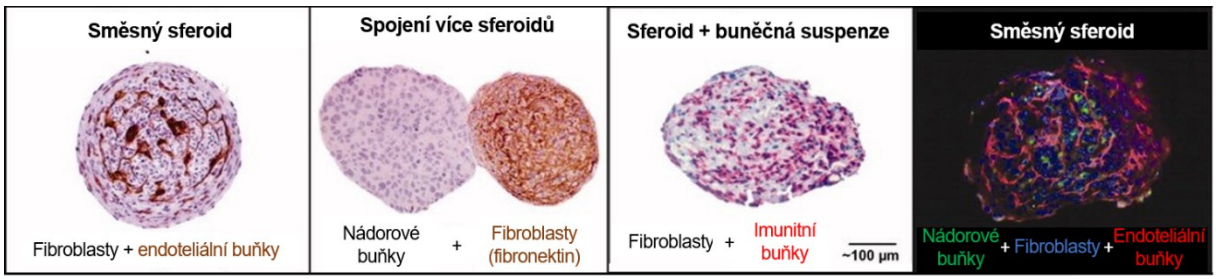


Obr. 5: Zóny buněk ve sferoidu a jejich metabolická aktivita (upraveno podle Friedrich et al., 2007 a Mehta et al., 2012; vytvořeno s využitím softwaru Biorender)

Pro přípravu sferoidů se využívá různých metod, všechny jsou však založeny na principu toho, že buňky preferují vzájemnou adhezi před adhezí k povrchu. Toho lze dosáhnout mechanicky nebo chemicky použitím neadhezivních substrátů; mezi mechanické způsoby přípravy sferoidů patří metoda

visící kapky (tzv. hanging drop), kdy je agregace buněk indukována gravitační silou. Do média je možné přidat viskózní látku (např. metylcelulózu), aby se zvýšila jeho hustota. Rovněž je možné sferoidy tvořit metodou rotačních kultur, která umožňuje sferoidy produkovat ve velkém počtu. Tato metoda je založena na neustálém míchání buněčné suspenze, které vede k agregaci buněk a tím i k formaci sferoidů. Nevýhodou je, že buňky mohou být při míchání mechanicky poškozeny (Nagelkerke et al., 2013). Mimo mechanické způsoby lze dále připravit sferoidy kultivací buněk na neadherentním povrchu, jakým je například agaróza. Tou je buď možné pokrýt dna jamek desky nebo s využitím komerčně dostupných plastových či silikonových forem připravit agarózové „mikro-formy“, do kterých je následně aplikována suspenze buněk (Costa et al., 2014).

Sferoidy lze tvořit z jedné nebo různých buněčných populací. Díky tomu je možné modelovat interakce nádorových buněk s buňkami stromálními, např. imunitními nebo mezenchymálními. Existují různé kokultivační strategie, mezi které patří kokultivace více buněčných populací, kultivace sferoidů v buněčné suspenzi a spojení více sferoidů dohromady (shrnuto v Friedrich et al., 2007) (Obr. 6). Při formaci sferoidů je výhodné rovněž využití fluorescenčně označených buněk, které umožní odlišení jednotlivých buněčných populací (Kondapaneni et al., 2022).



Obr. 6: Přehled kokultivačních strategií nádorových a stromálních buněk. Nejčastěji využívané jsou kultury nádorových buňky, imunitní buňky, fibroblasty a endotelové buňky (upraveno podle Friedrich et al., 2007).

Příkladem linie, která sferoidy formuje ochotně, jsou buňky plicního adenokarcinomu A549, které sferoidy většinou zformují do 4 dnů od nasazení (Friedrich et al., 2009). Ne všechny buněčné linie jsou však schopné sferoidy tvořit. Některé buňky potřebují pro tvorbu sferoidů Matrigel (tj. solubilizovaná matrice bazální membrány) nebo metylcelulózu (Froehlich et al., 2016).

Sferoidy jsou vhodné pro modelování nádorů, které jsou špatně vaskularizované, vykazují vysokou míru hypoxie a nedostatek živin. Jsou hojně využívanými modely pro studium invaze, proliferace, diferenciace a metabolismu nádorových buněk (Ivascu et al., 2006) Vhodné jsou také pro studium odpovědi nádorů na chemoterapii a radioterapii, protože třídimenzionální modely lépe vystihují nádory *in vivo*. Na buňky, které jsou blíže středu sferoidu nemusí mít radioterapie efekt a chemoterapeutika mohou být relativně méně dostupná (Friedrich et al., 2009).

Na sferoidech z fluorescenčně značených nádorových buněk z mozkové metastázy karcinomu prsu byl testován vliv chemoterapeutika paclitaxel. Bylo zjištěno, že vyšší koncentrace paclitaxelu inhibuje růst těchto sferoidů, životnost buněk však nebyla ovlivněna (Kondapaneni et al., 2022). Dále je možné s využitím sferoidů v kombinaci s hydrogely o rozličné tuhosti studovat dormanci a proliferaci nádorových buněk. Nádorové buňky proliferují rychleji na tuhých hydrogelech, což bylo potvrzeno i s využitím sféroidů (Kondapaneni et al., 2020).

4.2.2 Hydrogely a scaffoldy

Hydrogely a scaffoldy umožňují připravit třídimenzionální modely, které modelují nejen interakce mezi buňkami navzájem, ale také mezi buňkami a ECM.

Hydrogely jsou syntetické nebo přirozené polymery, které jsou schopné zadržet velké množství vody a ostatních biologických tekutin (v praxi je využíván např. fosfátový pufr nebo kultivační media). V onkologickém výzkumu jsou hojně využívány pro simulaci extracelulární matrix, jsou tedy vhodné pro studium chování buněk v kontextu okolního mikroprostředí včetně specifického mikroprostředí mozkové metastázy (shrnuto v Thakor et al., 2020). Jednotlivé hydrogely charakterizují jejich biochemické a mechanické vlastnosti. Mezi nejdůležitější biochemické vlastnosti hydrogelů, které ovlivňují chování buněk v nich, patří jejich degradabilita (tj. možnost hydrolytického štěpení) a tzv. denzita ligandu, tedy denzita peptidů obsahujících motiv arginylglycylaspartátové kyseliny (RGD motiv), které jsou specifickými ligandy pro integriny na povrchu nádorových buněk. Vazba nádorových buněk na ECM pomocí integrinů je zásadní pro adhezi a další biologické vlastnosti spojené s metastazováním. Mechanické vlastnosti hydrogelů, relevantní pro studium biologie nádorových buněk, jsou tuhost, bobtnání (z angl. swelling) a síťování (Pradhan & Slater, 2019). Tuhost hydrogelů lze modifikovat koncentrací síťovadla, čímž lze docílit tuhosti, která napodobuje ECM zdravého mozku (tuhost kolem 0,4kPa) nebo mozku s nádorem (tuhost kolem 4,5kPa) (Narkhede et al., 2020). Míru bobtnání ovlivňuje koncentrace síťovadla N-vinyl pyrolidinonu. Při jejím zvýšení dochází k redukci bobtnání kvůli zvýšenému síťování hydrogelu (Pradhan & Slater, 2019).

Důležitým parametrem charakterizujícím hydrogely je stupeň substituce (DS). Ten je ovlivněn složením hydrogelu a jeho bobtnáním. Jedná se o počet substitučních skupin připojených na základní jednotku polymeru. Pro různé hodnoty DS je do hydrogelů přidáváno různé množství karboxymetyl škrobu (Zahib et al., 2020) nebo N-vinyl pyrolidinonu (Pradhan & Slater, 2019). Využití hydrogelů s přesně definovaným DS je vhodné pro modelování chování nádorových buněk v prostředí s různou tuhostí ECM (Vasudevan et al., 2020).

Pro přípravu hydrogelů se využívají různé substráty. Nejčastěji se jedná o kyselinu hyaluronovou, která, jak již bylo zmíněno, představuje jednu z hlavních složek mozkové extracelulární matrix a interaguje s metastatickými nádorovými buňkami přes receptor CD44 (Jadin et al., 2015). Samotná HA je velice snadno degradovatelná a má velmi nízkou rigiditu; proto se pro přípravu

hydrogelů využívá modifikace metakrylátem. Hyaluronan-metakrylát může být následně polymerizován působením UV záření anebo s využitím síťovadla dithiothreitolu, jehož různé koncentrace zajišťují různou tuhost a elasticitu hydrogelů (Narkhede et al., 2020). Mezi další materiály vhodné pro přípravu hydrogelu patří fibrin (Liu et al., 2018) nebo polyethylenglykol (Pradhan & Slater, 2019).

Hydrogely se hojně využívají ke studiu dormance nádorových buněk, která je charakteristickým rysem buněk zakládajících metastázy. Sledováním exprese markerů různých fází buněčného cyklu u buněk MDA-MB-231BR bylo prokázáno, že tyto buňky vykazují dormantní fenotyp na měkkých hydrogelech, tuhostí odpovídajících ECM zdravého mozku, a na tuhých hydrogelech, reprezentujících ECM metastatického ložiska, naopak více proliferují. Dormance závislá na tuhosti hydrogelu je pravděpodobně reverzibilní a částečně závislá na fokální adhezní kináze (Narkhede et al., 2020). Na hydrogelech byla rovněž testována migrace buněk karcinomu prsu za nádorově asociovanými fibroblasty (CAF) z mozkových metastáz. Byl využit hydrogel založený na hyaluronanu s přídavkem polyethylen glykol diakrylátového (PEGDA) crosslinkeru a thiolem modifikovaného kolagenu. Bylo zjištěno, že agregáty CAF atrahují nádorové buňky, které k nim migrují přes hydrogel (Chung et al., 2017). Pomocí hydrogelů lze modelovat i migraci buněk přes hematoencefalickou bariéru. V práci Zahid et al byl na inzerty aplikován hydrogel ze směsi želatiny a metakrylátu, ve kterém byly navíc zality astrocyty; na povrch hydrogelu byly nasazeny endotelové buňky. Nakonec přes tuto soustavu migrovaly fluorescenčně označené buňky karcinomu prsu. Přídavek cisplatiny v tomto modelu signifikantně snížil migraci nádorových buněk (Augustine, Zahid, et al., 2021).

Kromě hydrogelů jsou v onkologickém výzkumu využívány i scaffoldy na bázi poly(laktát-ko-glykolidátu) (PLG) (Azarin et al., 2015) a polykaprolaktonu (PCL) (Rao et al., 2016). PLG saffoldy, vytvořené s využitím 3D tisku, byly testovány v potenciální terapeutické aplikaci. Vykazovaly hemostatický efekt a bylo testováno jejich „napuštění“ protinádorovými léčivy, která se z nich uvolňovala v kyselém pH (Shi et al., 2020). PLG a PCL jsou biodegradabilní materiály, při potenciálním terapeutickém využití by proto nemusely být tyto scaffoldy z těla opět vyjímány.

PCL scaffoldy dobře kopírují strukturu subarachnoidálního prostoru mozku. Proto byly využity k modelování leptomeningeálních metastáz, které v tomto místě tvoří meduloblastom. Adheze nádorových buněk na těchto scaffoldech závisí na porozitě a průměru vláken, ze kterých jsou scaffoldy složeny. Byla na nich rovněž zkoumána migrace a penetrace nádorových buněk, které byly pěstovány ve formě sferoidů, dovnitř do scaffoldu. Migrace buněk byla nižší, když byly sferoidy kultivovány na scaffoldech (Fowler et al., 2023). Při práci se scaffoldy *in vitro* byla rovněž pozorována zvýšená schopnost metastazování, progrese a kolonizace buněk karcinomu prsu oproti situaci ve 2D kultuře (Balachander et al., 2015). Pro výzkum mozkových metastáz nebyly PLG a PCL scaffoldy dosud využity, nicméně zejména pro výzkum leptomeningeálních metastáz se nabízejí jako model, který velmi dobře reprezentuje strukturu dané tkáně.

4.2.3 Tzv. brain slice culture

Pro modelování metastazování do mozku je vysoce relevantní model tzv. brain slice culture, kdy jsou sferoidy nebo suspenze nádorových buněk kultivovány na řezech z myších mozků. Buňky, které promigrovaly do řezů jsou fluorescenčně označeny a mohou být zobrazeny pomocí konfokálního mikroskopu. Tato metoda je vhodná pro pozorování invaze nádorových buněk do intaktní mozkové tkáně (Dankner et al., 2024). Stejná metoda byla využita i při modelování glioblastomu, jakožto primárního mozkového nádoru (Decotret et al., 2023).

4.2.4 Organoidy

Organoidy jsou třídimenzionální, mikroskopické, samoorganizující se struktury, které jsou tvořeny *in vitro* z pluripotentních kmenových buněk (PSC). Vystihují strukturu a funkce orgánů, ze kterých byly odvozeny. Organoidy mohou být odvozeny od lidských nebo myších PSC (shrnuto v Tuveson & Clevers, 2019). Pro modelování mozku se využívají cerebrální organoidy, které mohou představovat jeho různé regiony (Lancaster et al., 2013). Tyto cerebrální organoidy obsahují neurální progenitory, neurony a gliové buňky vytvořené z lidských PSC (Choe et al., 2020). Nemají však cévy a imunitní buňky, a proto nevystihují zcela přesně prostředí mozku *in vivo*. Je ale možná jejich kombinace s imunitními buňkami a fibroblasty, která umožňuje výzkum nádorového stromatu u organoidů. Rovněž zvyšuje jejich podobnost k mozku (shrnuto v Tuveson & Clevers, 2019).

Organoidy se připravují metodou rozhraní vzduch-kapalina (Neal et al., 2018). Kmenové buňky, ze kterých jsou tvořeny, se kultivují v Matrigelu v rotační kultuře, ve které je možné kultivovat též sferoidy (shrnuto v Tuveson & Clevers, 2019).

Je možné připravit organoidy jako model mozkové tkáně s přítomností metastázy. Pro tento účel sloužily v práci Choe et al. modifikované cerebrální organoidy, které byly připraveny kokultivací plicních nádorových buněk a přibližně 100 dnů starých cerebrálních organoidů odvozených od embryonálních kmenových buněk v rotační kultuře. Na těchto speciálních organoidech bylo prokázáno, že nádorové buňky si udržují stejnou proliferační kapacitu, kterou vykazují ve 2D kulturách (Choe et al., 2020). Tyto nádorové buňky mohou být specificky označené (např. fluorescenčním proteinem mKate2) a díky tomu je možné sledovat jejich invazi do organoidu. U buněk malobuněčného karcinomu plic bylo pozorováno, že nádorové buňky invadují do organoidů již během 24 hodin (shrnuto v Quaranta & Linkous, 2022).

Organoidy mají jako modely mozkových metastáz velký význam. Jejich využitím je možné predikovat, jaký účinek bude mít chemoterapie na nádorové buňky (H. M. Wang et al., 2023). Tato léčiva by však měla být dále otestována na schopnost průniku přes BBB, neboť tuto vlastnost na organoidech ověřit nelze. Organoidy jsou rovněž vhodné pro studium metastatického procesu v mozku. Příkladem léčiva testovaného na organoidech mozku s přítomností mozkové metastázy je inhibitor EGFR gefitinib.

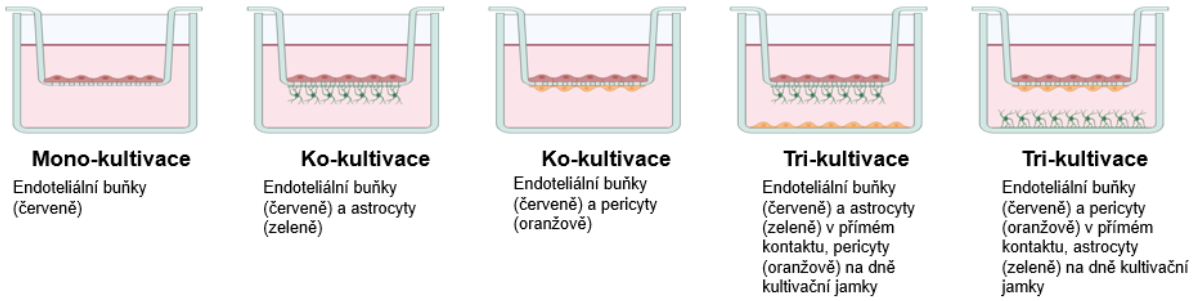
Byly využity nádorové buňky označené luciferázou, jejíž aktivita byla při přidání gefitinibu signifikantně snížena (Choe et al., 2020).

4.2.5 Modely simulující hematoencefalickou bariéru

Modely simulující hematoencefalickou bariéru hrají velkou roli ve výzkumu extravazace a buněk zakládajících mozkové metastázy a dále ve studiu průniku léčiv do mozku. BBB může být studována *in vivo* i *in vitro*. U modelů *in vivo* se měří koncentrace léčiv proniklých do cerebrospinální tekutiny modelových zvířat. Tento přístup však není příliš využíván kvůli náročnému provedení a vysoké ceně. *In vitro* modely zahrnují modely založené na tzv. transwell assay, která využívá kultivaci buněk na inzertech, a dále dynamické modely.

4.2.5.1 Modely BBB založené na tzv. transwell assay

Pro kokulturní modely založené na transwell assay se využívají endotelové buňky, astrocyty a pericyty, a to v různých variantách nasazení těchto buněk na kultivační inserty a do jamky. Tradiční uspořádání odpovídá struktuře BBB *in vivo* a zahrnuje nasazení endoteliálních buněk na vrchní stranu kolagenem potažené membrány inzertu, pericytů z druhé strany této membrány a astrocytů na dno jamky inzertu. Pomocí tohoto typu modelu BBB je možné testovat, která léčiva jsou schopna prostupu přes BBB (Nakagawa et al., 2009). Jiné varianty nasazení mohou zahrnovat mono-kultivaci, kokultivaci a trikultivaci jednotlivých buněčných typů (Hatherell et al., 2011) (Obr. 7).



Obr. 7: Transwell modely BBB (upraveno podle Hatherell et al., 2011; vytvořeno s využitím softwaru Biorender).

Jsou vytvářeny i modifikace této eseje jako např. insert modifikovaný želatinou a metakryloylem. Na tomto modelu byl testován efekt cisplatiny na migraci buněk karcinomu prsu MDA-MB-231 přes BBB a bylo zjištěno, že cisplatina tuto migraci inhibuje (shrnuto v Augustine, Aqel, et al., 2021). K měření prostupnosti BBB ve vztahu k formaci těsných spojů lze využít metodu měření transendoteliální elektrické rezistence (TEER). Nejvyšší hodnotu TEER vykazuje kokultivace astrocytů s endoteliálními buňkami (Hatherell et al., 2011). S využitím tohoto modelu BBB bylo rovněž demonstrováno, že transmigrace buněk melanomu přes BBB porušuje integritu endoteliální vrstvy. Toto poškození se projevuje snížením TEER a přítomností apoptotických endoteliálních buněk (Fazakas et al., 2011).

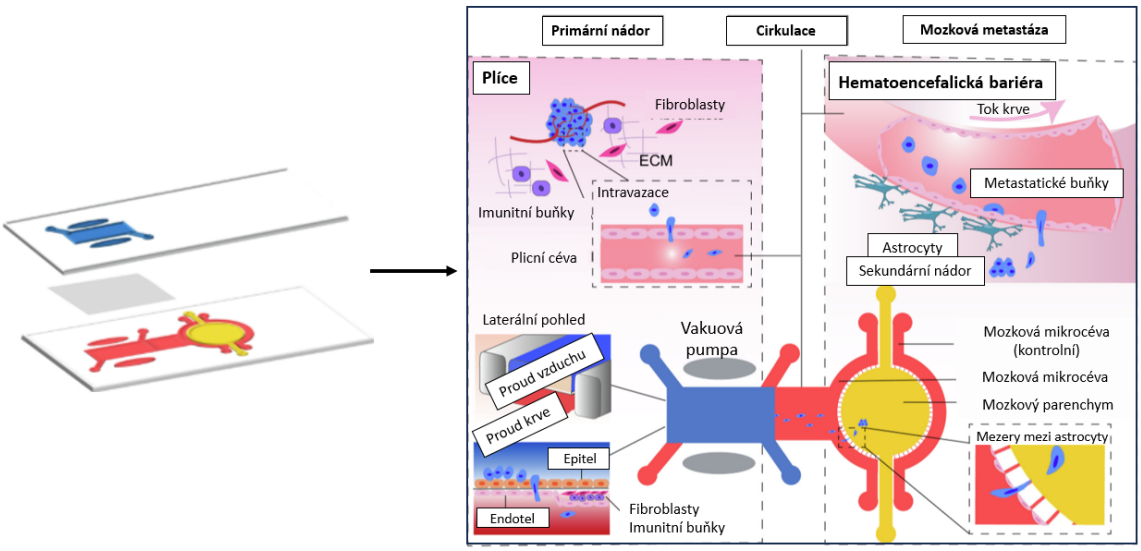
4.2.5.2 Dynamické modely BBB a tzv. lab-on-a-chip modely

V dynamickém modelu proudí tekutina, která může obsahovat nádorové nebo imunitní buňky, přes vrstvu buněk endotelu. Tím pádem zde působí třecí síla.

Dynamický model BBB byl použit ke studiu průchodu léčiv a imunitních buněk do centrálního nervového systému. Tento model byl vytvořen z dutých propylenových vláken, která byla uspořádána do aparatury se zdrojem média a s pulzní pumpou pro jeho kontinuální proudění. Vlákna byla na luminálním povrchu osazena endoteliálními buňkami, na abluminálním astrocyty. Povrch vláken byl opatřen póry; velikost pórů určovala, zda byla umožněna pouze výměna plynů a živin mezi luminálními a abluminálními kompartmenty, nebo také extravazace buněk. Permeabilita BBB v tomto modelu byla také monitorována metodou TEER. Na tomto modelu byl testován průchod protinádorových léčiv přes BBB po její dočasné permeabilizaci pomocí média obsahujícího mannitol a dále extravazace buněk skrz BBB (Cucullo et al., 2011).

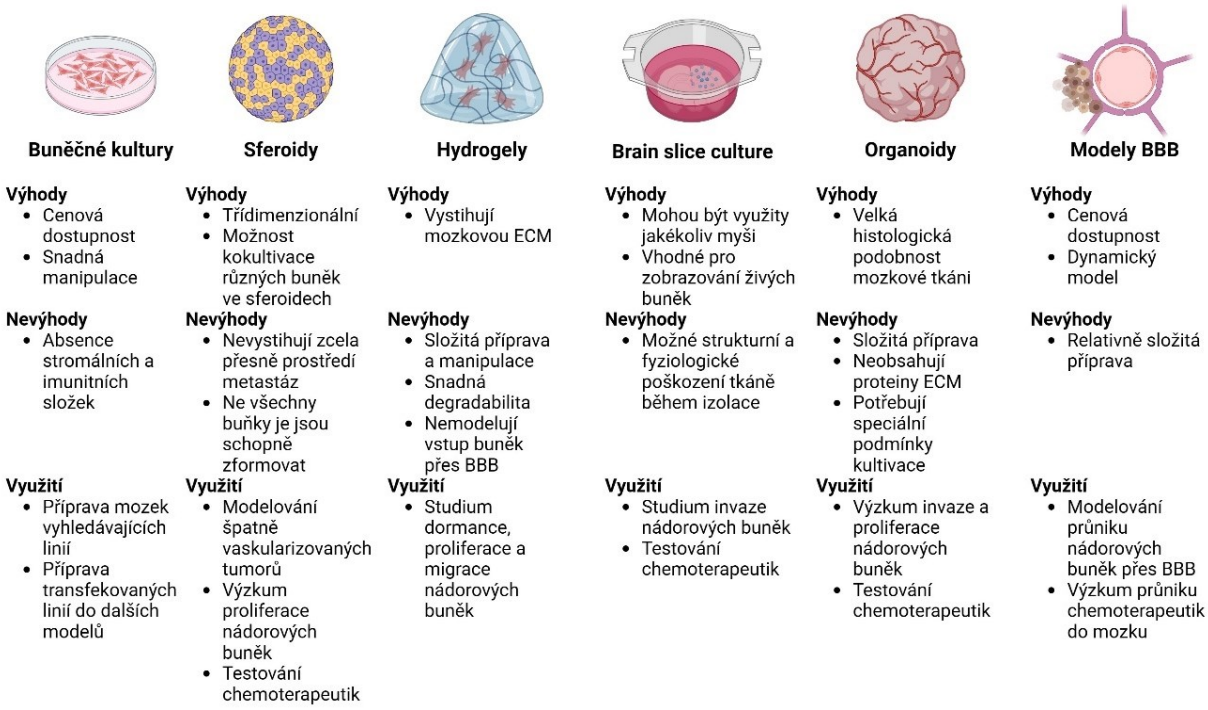
Xu et al. vyvinuli mikrofluidní systém, který byl schopen efektivně replikovat multicelulární architekturu, mechanické vlastnosti, 3D strukturu ECM a funkční odpověď BBB v normálních a patologických podmínkách. Na tomto modelu byl proveden výzkum, jak k integritě BBB přispívá vaskulární proudění a přítomnost astrocytů. Vystavení dynamickému toku signifikantně zvýšilo expresi proteinů endoteliálních těsných spojů a adhezivních proteinů. Také bylo zjištěno, že expresi těchto proteinů rovněž zvyšuje přídavek astrocytů k mikrovaskulárním endoteliálním buňkám. Tyto výsledky naznačují, že vaskulární tok a astrocyty přispívají k udržování integrity BBB zvýšením exprese proteinů těsných spojů v endoteliálních buňkách a rovněž zvyšují TEER mikrovaskulárních endoteliálních buněk. Na tomto modelu byl také sledován průnik nádorových buněk přes BBB. Bylo zjištěno, že buňky karcinomů plic, prsu a melanomu metastazující do mozku byly schopné BBB překonat a buňky karcinomu jater nikoliv, což odpovídá histopatologickému původu většiny mozkových metastáz. (Xu et al., 2016).

BBB lze modelovat s využitím platformy lab-on-a-chip. Ta byla popsána W. Liu et al. jako multiorgánový mikrofluidní čip modelující mozkové metastázy z karcinomu plic. Byla zkonstruována ze dvou částí, a to z „upstream“ modelu plic, reprezentující primární nádorové ložisko, a „downstream“ modelu mozku jako cíle pro metastazující buňky. Tyto části byly vzájemně propojeny kanálem, který rozdělovala BBB (Obr. 8). Na tomto modelu byla studována extravazace nádorových buněk (W. Liu et al., 2019).



Obr. 8: Schéma modelu lab-on-a-chip (upraveno podle W. Liu *et al.*, 2019).

Výhody, nevýhody a příklady využití *in vitro* modelů využívaných ve výzkumu biologie mozkových metastáz, jejich mikroprostředí a odpovědi na terapii jsou shrnuty v Obr. 9.



Obr. 9: Porovnání *in vitro* modelů mozkových metastáz (vytvořeno s využitím softwaru Biorender)

4.3 *In vivo* (zvířecí) modely

Důležitou roli ve výzkumu mozkových metastáz hrají zvířecí modely. Ty jsou využívány především pro získávání poznatků o metastatické kaskádě, výzkum vlivu nádorových buněk na organismus, testování protinádorových léčiv a pro potvrzení poznatků získaných *in vitro*. Majoritně jsou

využívány myší modely, řídce modely využívající jiná laboratorní zvířata (danio pruhované, potkan a další).

4.3.1 Myš (*Mus musculus*)

4.3.1.1 Xenografty

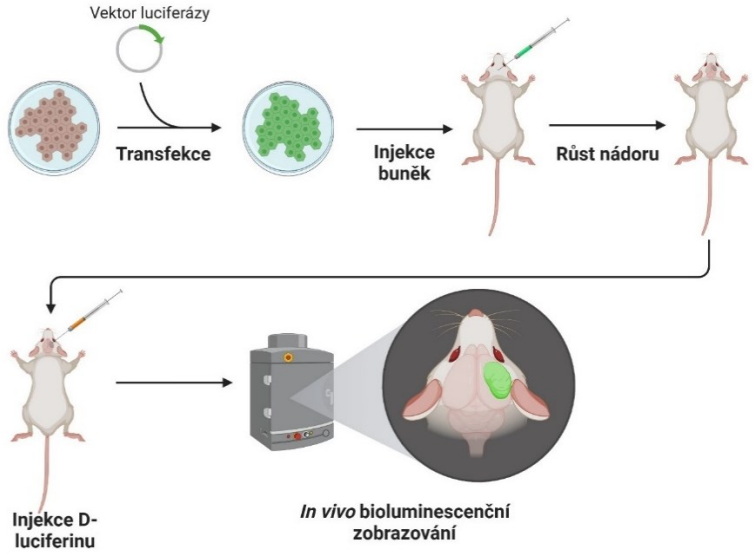
Jako xenografty označujeme nádorové štěpy transplantované z jedince jednoho druhu do jedince druhu jiného. U výzkumu nádorových onemocnění se provádí nejčastěji transplantace lidského materiálu převážně do myší. Jsou rozlišovány xenografty odvozené od buněčných linií (CDX) a od nádorové tkáně (PDX). Jsou využívány speciální imunodeficientní myši, aby nedošlo k odmítnutí nádorových buněk imunitním systémem hostitele. Příkladem je NSG myš, které chybí zralé B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky. Dále se využívají SCID myši, které chybí B- a T-lymfocyty (shrnuto v J. Chen et al., 2022).

Implantace nádorových buněk se u xenograftů provádí intrakraniálně nebo do systémového cévního řečiště (intrakardiálně nebo do arteria carotis interna). Intrakraniální implantace je vhodná pro studium mikroprostředí mozkových metastáz a efektu nových terapeutických přístupů. Nicméně, nádorové buňky při ní nemusí procházet přes BBB, a proto nereplikuje přesně kolonizaci mozku při metastatickém procesu. Po implantaci může rovněž dojít v mozku k zánětlivé reakci. Mezi výhody proti implantaci do tepenného řečiště patří rychlejší vývoj nádoru a jeho lokalizace na předem určeném místě.

Při implantaci nádorových buněk do systémového řečiště se buňky injikují intrakardiálně nebo intraarteriálně do arteria carotis interna. Těmito způsoby injekce lze modelovat a zkoumat definované části metastatického procesu, a to extravazaci a kolonizaci mozkové tkáně nebo propustnost hematoencefalické bariéry, a dále lze tento přístup využít také k selekci tzv. mozek vyhledávajících linií, jejichž příprava je popsána v kapitole 4.1 Buněčné kultury (Geisler et al., 2020). Intraarteriální injekce do arteria carotis interna je v porovnání s intrakardiální injekcí invazivnější a složitější zákrok. Zvyšuje se však šance, že dojde ke vzniku metastáz pouze v mozku, protože buňky cestou arteria carotis interna putují přímo do kapilární sítě mozku. Při intrakardiální injekci nádorových buněk může dojít ke vzniku metastáz i v jiných orgánech. Této skutečnosti může být využito pro porovnávání buněk metastazujících do různých orgánů (Sevenich et al., 2014). Při výzkumu mozkových metastáz to může znamenat i nevýhodu a to, že může dojít k prodloužení procesu přípravy mozek vyhledávajících linií.

V neposlední řadě se v rámci výzkumu mozkových metastáz provádí implantace i subkutánně a do tukové tkáně. Výhodou subkutánní implantace je její jednoduchá proveditelnost a snadný přístup ke vzniklému nádoru. Nevýhodou je, že nádorové buňky jsou implantovány do prostředí bohatého na imunitní buňky, které mohou způsobit odhojení vznikajícího nádoru. Místo implantace rovněž nereflektuje specifika mozkové tkáně.

Nádorové buňky implantované do myší bývají zobrazovány pomocí reporterového systému využívajícího transgenní exprese luciferázy (Obr. 10). Právě xenografty jsou modely, které jsou mimořádně vhodné pro výzkum mozkových metastáz z karcinomů plic, prsu a melanomu. Bylo totiž prokázáno, že lidské mozkové metastázy a xenografty od nich odvozené mají podobné profily genové exprese (Faria et al., 2022).



Obr. 10: Injekce buněk transfekovaných luciferázou a následná bioluminiscenční analýza vzniklého intrakraniálního nádoru (vytvořeno s využitím softwaru Biorender)

Xenografty jsou využívány k testování nových terapeutických přístupů, mezi jinými také k výzkumu vlivu radioterapie na nádorové buňky. Myši s implantovanými buňkami karcinomu prsu overexprimujícími HER2, BT474BrM3, byly vystaveny celomozkové radioterapii. Buňky byly upraveny tak, aby exprimovaly luciferázu a mCherry fluorescenční protein. Bylo prokázáno, že radioterapie vyvolává změny v cévním zásobení nádoru a tím zvýší absorpci fragmentů protilátek proti HER2. Toto by mohlo usnadnit využití radioaktivně značených fragmentů protilátek k detekci a léčbě mozkových metastáz exprimujících HER2 (Procissi et al., 2022). Dále byl na xenograftech proveden výzkum vlivu nanočástic jódu (INP) na účinnost radioterapie. Nádorové buňky karcinomu prsu byly implantovány intrakraniálně a INP intravenózně. Byly porovnány jednotlivé skupiny myší (neléčené, vystavené radioterapii a ty, kterým byly injikované INP a následně byly vystavené radioterapii) a bylo zjištěno, že aplikace INP v kombinaci s následnou radioterapií výrazně prodloužila přežití myší. Jód během radioterapie absorbuje rentgenové záření, tvoří volné radikály a způsobuje lokální poškození nádoru. Tím zesiluje lokální dávku radioterapie na nádor (Hainfeld et al., 2020).

S využitím xenograftů byl rovněž testován vliv protisrážlivých látek na tvorbu mozkových makrometastáz. Buňky karcinomu prsu byly injikovány intrakardiálně a přibližně po týdnu byla pozorována tvorba sraženin v mozkových cévách, která je spojena s úspěšnou extravazací nádorových

buněk. Proto by mohlo využití antikoagulantů znamenat jistou prevenci vzniku mozkových metastáz (Feinauer et al., 2021).

Kromě výzkumu zaměřeného na efektivitu a vývoj terapeutických přístupů probíhá s využitím myších modelů také základní výzkum biologie mozkových metastáz. Například, na modelu karcinomu prsu byla odhalena role N-Myc downstream regulovaného genu 1 (NDRG1) v růstu nádorů a mozkových metastázách. V tomto experimentu byly buňky karcinomu prsu implantovány do tukové tkáně nebo do ocasní žíly myši. Bylo zjištěno, že buňky vysoce exprimující NDRG1 u myší více tvořily mozkové metastázy a zároveň snižovaly přežití myší. Utlumení jeho exprese vedlo u myší k inhibici růstu primárního nádoru a mozkových metastáz (Villodre et al., 2021).

Dále byl proveden výzkum role mozkových endoteliálních buněk a astrocytů v ochraně nádorových buněk před chemoterapií prostřednictvím signalizace závislé na endotelinu. Do imunodeficientních myší byly intraarteriálně do arteria carotis interna injikovány luciferázou značené buňky karcinomu prsu (MDA-MB-231) a plicního adenokarcinomu (PC-14). Myším bylo následně podáváno cytostatikum paclitaxel a antagonista endotelinového receptoru macitentan v různých dávkách a byl monitorován jejich stav a doba přežití po podání obou látek. Podávání paclitaxelu a macitentanu samostatně nemělo na přežití myší žádný vliv. Skupina, které byla podávána kombinace těchto látek, vykazovala delší dobu přežití. Tato kombinace léčiv rovněž vyústila ve snížené dělení nádorových buněk a stimulovala apoptózu u nádorových a nádorově asociovaných endoteliálních buněk. Proto může být tento přístup novým způsobem terapie pro pacienty s mozkovými metastázami (H. J. Lee et al., 2015).

4.3.1.2 Syngenní myší modely

Jako syngenní jsou označovány modely v případě, že se jedná o transplantaci buněk mezi geneticky identickými jedinci nebo o implantaci geneticky shodných buněk. Implantaci lze rovněž provést různými způsoby, a to intrakraniálně, do systémového řečiště a do tukové tkáně. Výhodou syngenních modelů je, že je možné zkoumat mozkové metastázy v organismu s intaktním imunitním systémem. Proto jsou vhodné pro výzkum reakce imunitního systému na mozkové metastázy a hodnocení imunoterapeutických přístupů. V porovnání s xenografty však syngenní modely dosáhnou rychleji stavu, kdy velikost nádorů a klinický stav zvířat vyžadují ukončení experimentu. Toto limituje jak výzkum metastatické kaskády, tak výzkum účinku možných protinádorových léčiv.

Z důvodu omezené dostupnosti jsou syngenní modely méně využívané než xenografty, a počet studií, které je využívají, je omezený. Byl vyvinut model spontánních metastáz karcinomu prsu zvaný TBCP-1, který napodobuje metastazování HER2 pozitivního karcinomu prsu do mozku. Tento model byl využit pro testování efektu látky neratinib, která v experimentálních mozkových metastázách indukovala buněčnou smrt typu ferroptózy. Byla stanovena efektivní dávka neratinibu, která prodloužila přežití těchto myší bez přítomnosti závažných nežádoucích účinků (Nagpal et al., 2019). Dále byl

vyvinut syngenní model mozkových metastáz karcinomu plic, na kterém byl zkoumán vliv přídavku imunoterapie anti-CTLA-4 k radioterapii na mozkové metastázy. Bylo zjištěno, že efektivita imunoterapie záleží na vhodném načasování. Pokud byla aplikována před provedením radioterapie, tak neměla na nádor žádný vliv. Pokud však byla imunoterapie aplikována po několika cyklech radioterapie a zároveň do 12 hodin po jejím ukončení, došlo ke snížení nálože nádoru. V případě aplikace imunoterapie 24 hodin před provedením radioterapie k tomuto snížení nedošlo. Dále bylo v této studii naznačeno, že kombinace anti-CTLA-4 imunoterapie a radioterapie neměla u myší vliv na přežití (Blethen et al., 2024).

4.3.1.3 Myší modely vytvořené genetickým inženýrstvím (GEMM)

Myší modely vytvořené genetickým inženýrstvím (GEMM) jsou ve výzkumu metastáz obecně používány poměrně řídce, protože u nich ke vzniku metastáz spíše nedochází. Může to být proto, že nádory v těchto myších nejsou tak komplexní jako lidské a také jsou GEMM konstruovány tak, aby vytvořily primární nádor co nejrychleji, často tak nedospějí do stadia tvorby metastáz. Aby byly nádorové buňky schopné v GEMM metastazovat, tak je potřeba indukovat mutace v onkogenech a tumor supresorových genech. Pro mozkové metastázy jsou typické mutace v *BRAF* a *KRAS* (Jacob et al., 2015). Mozkové metastázy jsou u GEMM jedny z nejméně častých a byly popsány jen velmi řídce. Příkladem může být myší model pro neuroendokrinní plicní nádory, kde je u zvířat provedena inaktivace Rb1 a Trp53 (Meuwissen et al., 2003).

Příklady využití myších modelů, rozdělené podle použitého způsobu implantace nádorových buněk, v základním a aplikovaném výzkumu mozkových metastáz jsou shrnuty v Tab. 1.

Intrakardiálně

Autor	*Model*	*Kultury*	*Cíl*
Faria et al., 2022	Xenografty	MET-CF78, MET-CF89, MET-CF70, MET-CF69, MET-CF29, MET-CF81	Porovnání metastatických schopností nádorových buněk při různých způsobech implantace a srovnání profilů genové exprese lidských mozkových metastáz a od nich odvozených xenografů
Feinauer et al., 2021	Xenografty	Jimt1, A2058, H1Dl2	Výzkum vlivu antikoagulační terapie na formování mozkových metastáz
Nagpal et al., 2019	Syngenní	TBCP-1	Výzkum vlivu inhibice receptoru pro endotelin na růst a progresi mozkových metastáz
Blethen et al., 2024	Syngenní	LLC-Luc2	Výzkum vlivu imunoterapie v kombinaci s radioterapií na mozkové metastázy

Intraarteriálně do arteria carotis interna

Autor	*Model*	*Kultury*	*Cíl*
Lee et al., 2015	Xenografty	MDA-MB-231, PC14	Výzkum role mozkových endoteliálních buněk a astrocytů v ochraně nádorových buněk před chemoterapií

Intrakraniálně

Autor	*Model*	*Kultury*	*Cíl*
Faria et al., 2022	viz. Intrakardiálně		
Procissi et al., 2022	Xenografty	BT474BrM3	Výzkum vlivu radioterapie na nádorovou tkáň
Hainfeld et al., 2020	Xenografty	MDA-MB-231	Výzkum vlivu podání nanočástic jódu na účinnost radioterapie

Subkutánně

Autor	*Model*	*Kultury*	*Cíl*
Faria et al., 2022	viz. Intrakardiálně		
Villodre et al., 2021	Xenografty	SUM149, MDA-IBC3	Výzkum role NDRG1 v agresivním karcinomu prsu a mozkových metastázách

Tab. 1: Příklady využití myších modelů ve výzkumu mozkových metastáz podle způsobu injekce buněk.

4.3.2 Dánio pruhované (*Danio rerio*, tzv. zebrafish)

Dánio pruhované je model, který je díky vysoké míře homologie se savčí fyziologií a genetikou možné použít pro studium lidských malignit. Je však vhodné provádět k experimentům na dániu doplňující experimenty na myších modelech. Na embryích dánia byla například testována schopnost průniku léčiv blokujících kinázu EGFR osimertinibu a gefitinibu přes hematoencefalickou bariéru a jejich efekt na mozkové metastázy z buněk nemalobuněčného karcinomu plic. Prostřednictvím imunohistochemické analýzy bylo zjištěno, že buňky H1975 jsou citlivější na vystavení osimertinibu než gefitinibu. U buněk A549 byl efekt obou látek stejný (Fan et al., 2021).

4.3.3 Potkan (*Rattus norvegicus*)

Dalším modelovým organismem, který umožňuje studium mozkových metastáz, je potkan. Stejně jako u myší jsou využívána imunodeficientní zvířata. Do potkanů byly například intrakraniálně implantovány sferoidy z nádorových buněk získaných z mozkových metastáz. Následně byla sledována doba, za kterou se v potkaních mozcích z těchto sferoidů vyvinou nádory. Sferoidy byly rovněž potkanům implantovány subkutánně a bylo zjištěno, že po tomto způsobu implantace se u potkanů nádor nevyvinul. Tato skutečnost může ukazovat na to, že některé nádorové buňky metastazující do mozku vytvoří nádor pouze při intrakraniálním způsobu implantace (J. Wang et al., 2011).

5 Závěr

Mozkové metastázy patří mezi nejzávažnější komplikace nádorových onemocnění a jejich prognóza zůstává i přes pokroky v diagnostice a terapii velmi špatná. Vyvolávají intrakraniální hypertenzi spojenou s mozkovým otokem a ničí tak mozková centra včetně životně důležitých v mozkovém kmeni. Stejně jako metastázy v ostatních orgánech mají i mozkové metastázy negativní vliv na zdravou tkáň v bezprostředním okolí, mění metabolismus pacienta a vedou k jeho celkovému chátrání a ke smrti.

Pro vznik mozkových metastáz platí obecné faktory metastazování, avšak mají i významná specifika daná odlišností mozkové tkáně, na která je třeba při výzkumu jejich biologie a vývoji nových terapeutických přístupů brát zřetel. Mezi tato specifika patří především přítomnost hematoencefalické bariéry, kterou musí metastatické buňky překonat.

Vzhledem k obtížím při studiu mozkových metastáz, vysoké úmrtnosti pacientů a jejich neustále narůstající incidenci mají zásadní význam modelové systémy, které slouží jako nástroj pro pochopení základních molekulárních principů vedoucích k metastazování do mozku. Díky těmto znalostem by mohlo být možné cílit na nádorové buňky metastazující do mozku již v časné fázi metastatického procesu a tím snížit riziko vzniku metastáz nebo mu zcela zabránit. Rovněž jsou nezbytné pro testování nových terapeutických přístupů cílících proti metastatickým buňkám. Důležité je však vybrat pro testování specifického biologického aspektu vzniku a progrese mozkových metastáz správný model.

V této práci jsou shrnuty informace o preklinických modelech mozkových metastáz od jednodušších, jako jsou buněčné kultury, až po komplexní v podobě zvířecích modelů.

Pro výzkum jsou vhodné buněčné kultury, které jsou zároveň nejuniverzálnějším modelem a je možné z nich konstruovat modely komplexnější. Rovněž je možné je implantovat do modelových zvířat *in vivo* a zkoumat tak metastatický proces přímo v organismu. Je však mnoho aspektů, které buněčné kultury nereflektují, a proto je nutné pro výzkum využívat i složitější modely.

Pro výzkum migrace a proliferace nádorových buněk je výhodné využívat třídimenzionální modely jako jsou například sferoidy nebo organoidy. Ty jsou rovněž vhodné pro studium protinádorové terapie. V porovnání s buněčnými kulturami je však jejich příprava složitější.

Jak bylo diskutováno výše, důležitým bodem metastazování buněk do mozku je průchod přes BBB. Proto mají zásadní význam ve výzkumu mozkových metastáz modely BBB, díky kterým je možné studovat průnik buněk i terapeutik přes tuto bariéru.

Pro studium metastatického procesu a chování metastatických nádorových buněk v rámci organismu jsou využívány zvířecí modely. Nejčastěji se jedná o imunodeficientní myši, je však možné využívat i potkany nebo dánio pruhované. U myších modelů jsou nejvyužívanější xenografty, do nichž lze implantovat nádorové buňky různými způsoby. Každý způsob je vhodný pro studium jiného biologického aspektu, ale nádorové buňky nemusí vyvinout nádor u každého způsobu implantace.

Závěrem je vhodné podotknout, že každý model má své výhody, ale i nevýhody a je vhodný pro výzkum jiného aspektu procesu vzniku a progrese mozkových metastáz a jejich odpovědi na terapii. Pro řešení komplexních biologických problémů je tak důležité modely vhodně kombinovat. I přes existenci poměrně rozsáhlého spektra preklinických modelů mozkových metastáz je stále prostor pro jejich vylepšování. Modely co nejvěrněji reprezentující situaci *in situ* poskytují největší prostor pro vývoj nových a účinných terapeutických přístupů.

6 Seznam použité literatury

Ahmed, K. A., Kim, S., Arrington, J., Arash, ·, Naghavi, O., Thomas, ·, Dilling, J., Ben, ·, Creelan, C., Scott, ·, Antonia, J., Caudell, J. J., Louis, ·, Harrison, B., Sahebjam, S., Gray, J. E., Etame, A. B., Johnstone, P. A., Yu, M., & Perez, B. A. (2017). Outcomes targeting the PD-1/PD-L1 axis in conjunction with stereotactic radiation for patients with non-small cell lung cancer brain metastases. *J Neurooncol*, *3*, 331–338. https://doi.org/10.1007/s11060-017-2437-5

Alvarado, G., Noor, R., Bassett, R., Papadopoulos, N. E., Kim, K. B., Hwu, W.-J., Bedikian, A., Patel, S., Hwu, P., & Davies, M. A. (2012). *Risk of intracranial hemorrhage with anticoagulation therapy in melanoma patients with brain metastases*. https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e328353efd8

Ando, Y., Okada, H., Takemura, G., Suzuki, K., Takada, C., Tomita, H., Zaikokuji, R., Hotta, Y., Miyazaki, N., Yano, H., Muraki, I., Kuroda, A., Fukuda, H., Kawasaki, Y., Okamoto, H., Kawaguchi, T., Watanabe, T., Doi, T., Yoshida, T., … Ogura, S. (2018). Brain-Specific Ultrastructure of Capillary Endothelial Glycocalyx and Its Possible Contribution for Blood Brain Barrier. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-35976-2

Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Christer Betsholtz, &. (2010). *Pericytes regulate the blood-brain barrier*. https://doi.org/10.1038/nature09522

*Augustine, R., Aqel, A. H., Kalva, N., Joshy, K. S., Nayeem, A., & Hasan, A. (2021). Bioengineered microfluidic blood-brain barrier models in oncology research. *Translational Oncology*, *14*, 101087. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101087

Augustine, R., Zahid, A. A., Mraiche, F., Alam, K., Al Moustafa, A. E., & Hasan, A. (2021). Gelatin-methacryloyl hydrogel based in vitro blood–brain barrier model for studying breast cancer-associated brain metastasis. *Pharmaceutical Development and Technology*, *26*(4), 490–500. https://doi.org/10.1080/10837450.2021.1872624

Azarin, S. M., Yi, J., Gower, R. M., Aguado, B. A., Sullivan, M. E., Goodman, A. G., Jiang, E. J., Rao, S. S., Ren, Y., Tucker, S. L., Backman, V., Jeruss, J. S., & Shea, L. D. (2015). *ARTICLE In vivo capture and label-free detection of early metastatic cells*. https://doi.org/10.1038/ncomms9094

*Bailleux, C., Eberst, L., & Bachelot, T. (2020). *Treatment strategies for breast cancer brain metastases*. https://doi.org/10.1038/s41416-020-01175-y

Balachander, G. M., Balaji, S. A., Rangarajan, A., & Chatterjee, K. (2015). Enhanced Metastatic Potential in a 3D Tissue Scaffold toward a Comprehensive in Vitro Model for Breast Cancer Metastasis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *7*(50), 27810–27822. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.5B09064

Bao, Y., Zhang, S., Chen, Z., Chen, A. T., Ma, J., Deng, G., Xu, W., Zhou, J., Yu, Z. Q., Yao, G., & Chen, J. (2020). Synergistic Chemotherapy for Breast Cancer and Breast Cancer Brain Metastases via Paclitaxel-Loaded Oleanolic Acid Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, *17*(4), 1343–1351. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00044

Batiuk, M. Y., Martirosyan, A., Wahis, J., de Vin, F., Marneffe, C., Kusserow, C., Koeppen, J., Viana, J. F., Oliveira, J. F., Voet, T., Ponting, C. P., Belgard, T. G., & Holt, M. G. (2020). Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-14198-8

Berghoff, A. S., Fuchs, E., Ricken, G., Mlecnik, B., Bindea, G., Spanberger, T., Hackl, M., Widhalm, G., Dieckmann, K., Prayer, D., Bilocq, A., Heinzl, H., Zielinski, C., Bartsch, R., Birner, P., Galon, J., & Preusser, M. (2016). Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with extent of brain edema and overall survival time in patients with brain metastases. *OncoImmunology*, *5*(1). https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1057388

Blethen, K. E., Wolford, · C P, Pecar, · G L, Arsiwala, · T A, Adjeroh, · E, Dykstra, · L P, Kielkowski, · B N, & Lockman, · P R. (2024). *Coordination of anti-CTLA-4 with whole-brain radiation therapy decreases tumor burden during treatment in a novel syngeneic model of lung cancer brain metastasis*. *73*, 20. https://doi.org/10.1007/s00262-023-03599-w

Bonneau, C., Paintaud, G., Trédan, O., Dubot, C., Desvignes, C., Dieras, V., Taillibert, S., Tresca, P., Turbiez, I., Li, J., Passot, C., Mefti, F., Mouret-Fourme, E., Le Rhun, E., Gutierrez, M., & Gutierrez, M. (2018). *Phase I feasibility study for intrathecal administration of trastuzumab in patients with HER2 positive breast carcinomatous meningitis*. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.02.032

Bos, P. D., Zhang, X. H. F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R. R., Nguyen, D. X., Minn, A. J., Van De Vijver, M. J., Gerald, W. L., Foekens, J. A., & Massagué, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, *459*(7249), 1005–1009. https://doi.org/10.1038/nature08021

Busatto, S., Yang, Y., Walker, S. A., Davidovich, I., Lin, W. H., Lewis-Tuffin, L., Anastasiadis, P. Z., Sarkaria, J., Talmon, Y., Wurtz, G., & Wolfram, J. (2020). Brain metastases-derived extracellular vesicles induce binding and aggregation of low-density lipoprotein. *Journal of Nanobiotechnology*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s12951-020-00722-2

Cao, J., Wu, X., Qin, X., & Li, Z. (2021). *Uncovering the Effect of Passage Number on HT29 Cell Line Based on the Cell Metabolomic Approach*. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00806

Contreras-Zárate, M. J., Day, N. L., Ormond, D. R., Borges, V. F., Tobet, S., Gril, B., Steeg, P. S., & Cittelly, D. M. (2019). Estradiol induces BDNF/TrkB signaling in triple-negative breast cancer to

promote brain metastases. *Oncogene*, *38*(24), 4685–4699. https://doi.org/10.1038/s41388-019-0756-z

Costa, E. C., Gaspar, V. M., Coutinho, P., & Correia, I. J. (2014). Optimization of Liquid Overlay Technique to Formulate Heterogenic 3D Co-Cultures Models. *Biotechnol. Bioeng*, *111*, 1672–1685. https://doi.org/10.1002/bit.25210/abstract

Cucullo, L., Marchi, N., Hossain, M., & Janigro, D. (2011). A dynamic in vitro BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *31*(2), 767–777. https://doi.org/10.1038/JCBFM.2010.162

*Custódio-Santos, T., Videira, M., & Brito, M. A. (2017). *Brain metastasization of breast cancer*. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.03.004

Dankner, M., Maritan, S. M., Priego, N., Kruck, G., Nkili-Meyong, A., Nadaf, J., Zhuang, R., Annis, M. G., Zuo, D., Nowakowski, A., Biondini, M., Kiepas, A., Mourcos, C., Le, P., Charron, F., Inglebert, Y., Savage, P., Théret, L., Guiot, M.-C., … Siegel, P. M. (2024). Invasive growth of brain metastases is linked to CHI3L1 release from pSTAT3-positive astrocytes. *Neuro-Oncology*. https://doi.org/10.1093/neuonc/noae013

Decotret, L. R., Shi, R., Thomas, K. N., Hsu, M., Pallen, C. J., & Bennewith, K. L. (2023). Development and validation of an advanced ex vivo brain slice invasion assay to model glioblastoma cell invasion into the complex brain microenvironment. *Frontiers in Oncology*, *13*. https://doi.org/10.3389/FONC.2023.976945/FULL

Dragulescu-Andrasi, A., Liang, G., & Rao, J. (2009). In vivo bioluminescence imaging of furin activity in breast cancer cells using bioluminogenic substrates. *Bioconjugate Chemistry*, *20*(8), 1660–1666. https://doi.org/10.1021/bc9002508

*Ewend, M. G., Morris, D. E., Carey, L. A., Ladha, A. M., Brem, S., Hill, C., & Carolina, N. (2008). *From the Guidelines for the Initial Management of Metastatic Brain Tumors: Role of Surgery, Radiosurgery, and Radiation Therapy*. www.medscape.com/

Fan, R.-Y., Wu, J.-Q., Liu, Y.-Y., Liu, X.-Y., Qian, S.-T., Li, C.-Y., Wei, P., Song, Z., & He, M.-F. (2021). Zebrafish xenograft model for studying mechanism and treatment of non-small cell lung cancer brain metastasis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *40*, 371. https://doi.org/10.1186/s13046-021-02173-5

Faria, C. C., Cascão, R., Custódia, C., Paisana, E., Carvalho, T., Pereira, P., Roque, R., Pimentel, J., Miguéns, J., Cortes-Ciriano, I., & Barata, J. T. (2022). Patient-derived models of brain metastases recapitulate human disseminated disease. *Cell Reports Medicine*, *3*(5). https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100623

Farris, M. K., Wheless, W. H., Hughes, R. T., Soike, M. H., Masters, A. H., Helis, C. A., Chan, M. D., Cramer, C. K., Ruiz, J., Lycan, T., Petty, W. J., Ahmed, T., Leyrer, C. M., & Blackstock, A. W. (2019). Limited-Stage Small Cell Lung Cancer: Is Prophylactic Cranial Irradiation Necessary? *Practical Radiation Oncology*, *9*(6), e599–e607. https://doi.org/10.1016/j.prro.2019.06.014

Fazakas, C., Wilhelm, I., Nagyo ″ Szi, P., Farkas, A. E., & Haskó, J. (2011). Transmigration of Melanoma Cells through the Blood-Brain Barrier: Role of Endothelial Tight Junctions and Melanoma-Released Serine Proteases. *PLoS ONE*, *6*(6), 20758. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020758

Feinauer, M. J., Schneider, S. W., Berghoff, A. S., Robador, J. R., Tehranian, C., Karreman, M. A., Venkataramani, V., Solecki, G., Grosch, J. K., Gunkel, K., Kovalchuk, B., Mayer, F. T., Fischer, M., Breckwoldt, M. O., Brune, M., Schwab, Y., Wick, W., Bauer, A. T., & Winkler, F. (2021). *Local blood coagulation drives cancer cell arrest and brain metastasis in a mouse model*. http://ashpublications.org/blood/article-pdf/137/9/1219/1801527/bloodbld2020005710.pdf

Fokas, E., Henzel, M., Surber, G., Kleinert, G., Hamm, K., & Engenhart-Cabillic, R. (2012). *Stereotactic radiosurgery and fractionated stereotactic radiotherapy: comparison of efficacy and toxicity in 260 patients with brain metastases*. https://doi.org/10.1007/s11060-012-0868-6

Fowler, M. J., Riley, C. O., Tomasson, E., Mehta, S., Grande-Allen, J., Ballester, L., Sandberg, D. I., Janssen, C. F., & Sirianni, R. W. (2023). *Engineering subarachnoid trabeculae with electrospun poly(caprolactone) (PCL) scaffolds to study leptomeningeal metastasis in medulloblastoma*. https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213646

*Friedrich, J., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - Old hat or new challenge? In *International Journal of Radiation Biology* (Roč. 83, Čísla 11–12, s. 849–871). https://doi.org/10.1080/09553000701727531

Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nature Protocols*, *4*(3), 309–324. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226

Froehlich, K., Haeger, J.-D., Heger, J., Pastuschek, J., Photini, S. M., Yan, Y., Lupp, A., Pfarrer, C., Mrowka, R., Schleußner, E., Markert, U. R., & Schmidt, A. (2016). Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2

Frühauf, M., Zeitschel, U., Höfling, C., Ullm, F., Rabiger, F. V., Alber, G., Pompe, T., Müller, U., & Roßner, S. (2021). Construction of a 3D brain extracellular matrix model to study the interaction between microglia and T cells in co-culture. *European Journal of Neuroscience*, *53*(12), 4034–4050. https://doi.org/10.1111/EJN.14978

*Galea, I. (2021). The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. In *Cellular and Molecular Immunology* (Roč. 18, Číslo 11, s. 2489–2501). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41423-021-00757-x

Geisler, J. A., Spehar, J. M., Steck, S. A., Bratasz, A., Shakya, R., Powell, K., & Sizemore, G. M. (2020). *Modeling Brain Metastases Through Intracranial Injection and Magnetic Resonance Imaging HHS Public Access*. https://doi.org/10.3791/61272

*Geissler, M., Jia, W., Kiraz, E. N., Kulacz, I., Liu, X., Rombach, A., Prinz, V., Jussen, D., Kokkaliaris, K. D., Medyouf, H., Sevenich, L., Czabanka, M., & Broggini, T. (2023). The Brain Pre-Metastatic Niche: Biological and Technical Advancements. *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 10055*, *24*(12), 10055. https://doi.org/10.3390/IJMS241210055

Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Kenneth Baillie, J., Stevens, M. P., Freeman, T. C., Summers, K. M., & McColl, B. W. (2016). Microglial brain regionâ 'dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience*, *19*(3), 504–516. https://doi.org/10.1038/nn.4222

Hainfeld, J. F., Ridwan, S. M., Stanishevskiy, F. Y., & Smilowitz, H. M. (2020). *iodine nanoparticle radiotherapy of human breast cancer growing in the brains of athymic mice*. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72268-0

Hasanov, M., Milton, D. R., Davies, A. B., Sirmans, E., Saberian, C., Posada, E. L., Opusunju, S., Gershenwald, J. E., Torres-Cabala, C. A., Burton, E. M., Colen, R. R., Huse, J. T., Glitza Oliva, I. C., Chung, C., McAleer, M. F., McGovern, S. L., Yeboa, D. N., Kim, B. Y. S., Prabhu, S. S., … Ferguson, S. D. (2023). Changes in outcomes and factors associated with survival in melanoma patients with brain metastases. *Neuro-Oncology*, *25*(7), 1310–1320. https://doi.org/10.1093/neuonc/noac251

Hatherell, K., Couraud, P.-O., Romero, I. A., Weksler, B., & Pilkington, G. J. (2011). Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models-brain barrier Human model Transwell model Human pericytes hCMEC/D3 Trans-endothelial electrical resistance. *Journal of Neuroscience Methods*, *199*, 223–229. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.05.012

Hebert, J. D., Myers, S. A., Naba, A., Abbruzzese, G., Lamar, J. M., Carr, S. A., & Hynes, R. O. (2020). *Proteomic Profiling of the ECM of Xenograft Breast Cancer Metastases in Different Organs Reveals Distinct Metastatic Niches*. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2961

Hohensee, I., Chuang, H.-N., Grottke, A., Werner, S., Schulte, A., Horn, S., Lamszus, K., Bartkowiak, K., Witzel, I., Westphal, M., Matschke, J., Glatzel, M., Jücker, M., Pukrop, T., Pantel, K., &

Wikman, H. (2017). Oncotarget 6155 www.impactjournals.com/oncotarget PTEN mediates the cross talk between breast and glial cells in brain metastases leading to rapid disease progression. In *Oncotarget* (Roč. 8, Číslo 4). www.impactjournals.com/oncotarget/

Horibe, T., Torisawa, A., Akiyoshi, R., Hatta-Ohashi, Y., Suzuki, H., & Kawakami, K. (2014). Transfection efficiency of normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by single-cell bioluminescence imaging. *Luminescence*, *29*(1), 96–100. https://doi.org/10.1002/BIO.2508

Horstman, H., Gruhl, J., Smith, · Lynette, Ganti, A. K., & Shonka, N. A. (2018). Safety of long-term anticoagulation in patients with brain metastases. *Medical Oncology*, *35*, 43. https://doi.org/10.1007/s12032-018-1101-z

*Hoshide, R., & Jandial, R. (2017). The role of the neural niche in brain metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, *34*, 369–376. https://doi.org/10.1007/s10585-017-9857-7

Chen, E. I., Hewel, J., Krueger, J. S., Tiraby, C., Weber, M. R., Kralli, A., Becker, K., Yates Iii, J. R., & Felding-Habermann, B. (2007). Adaptation of Energy Metabolism in Breast Cancer Brain Metastases. *Cancer Res*, *67*(4), 1472–1486. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3137

*Chen, J., Liao, S., Xiao, Z., Pan, Q., Wang, X., Shen, K., Wang, S., Yang, L., Guo, F., Liu, H. F., & Pan, Q. (2022). The development and improvement of immunodeficient mice and humanized immune system mouse models. In *Frontiers in Immunology* (Roč. 13). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007579

Choe, M. S., Kim, J. S., Yeo, H. C., Bae, C. M., Han, H. J., Baek, K., Chang, W., Lim, K. S., Yun, S. P., Shin, I. S., & Lee, M. Y. (2020). A simple metastatic brain cancer model using human embryonic stem cell-derived cerebral organoids. *FASEB Journal*, *34*(12), 16464–16475. https://doi.org/10.1096/fj.202000372R

Chung, B., Esmaeili, A. A., Gopalakrishna-Pillai, S., Murad, J. P., Andersen, E. S., Reddy, N. K., Srinivasan, G., Armstrong, B., Chu, C., Kim, Y., Tong, T., Waisman, J., Yim, J. H., Badie, B., & Lee, P. P. (2017). ARTICLE Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12. *npj Breast Cancer*, *3*, 6. https://doi.org/10.1038/s41523-017-0008-8

Ilhan-Mutlu, A., Siehs, C., Berghoff, A. S., Ricken, G., Widhalm, G., Wagner, L., & Preusser, M. (2016). Expression profiling of angiogenesis-related genes in brain metastases of lung cancer and melanoma. *Tumor Biology*, *37*(1), 1173–1182. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3790-7

Ivascu, A., & Kubbies, M. (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*, *11*(8), 922–932. https://doi.org/10.1177/1087057106292763

Jacob, L. S., Vanharanta, S., Obenauf, A. C., Viale, A., Socci, N. D., & Massagu, J. (2015). *Metastatic Competence Can Emerge with Selection of Preexisting Oncogenic Alleles without a Need of New Mutations*. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0562

Jadin, L., Pastorino, S., Symons, R., Nomura, N., Jiang, P., Juarez, T., Makale, M., & Kesari, S. (2015). Hyaluronan expression in primary and secondary brain tumors. *Ann Transl Med*, *3*(6), 80. https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.04.07

Jin, Y., Kang, Y., Peng, X., Yang, L., Li, Q., Mei, Q., Chen, X., Hu, G., Tang, Y., & Yuan, X. (2021). Irradiation-induced activated microglia affect brain metastatic colonization of nsclc cells via mir-9/cdh1 axis. *OncoTargets and Therapy*, *14*, 1911–1922. https://doi.org/10.2147/OTT.S301412

Kalkanis, S. N., Kondziolka, D., Gaspar, L. E., Burri, S. H., Asher, A. L., Cobbs, C. S., Ammirati, M., Robinson, P. D., Andrews, D. W., Loeffler, J. S., McDermott, M., Mehta, M. P., Mikkelsen, T., Olson, J. J., Paleologos, N. A., Patchell, R. A., Ryken, T. C., & Linskey, M. E. (2010). The role of surgical resection in the management of newly diagnosed brain metastases: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. In *Journal of Neuro-Oncology* (Roč. 96, Číslo 1, s. 33–43). https://doi.org/10.1007/s11060-009-0061-8

Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., … Lyden, D. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, *438*(7069), 820–827. https://doi.org/10.1038/nature04186

Kim, S.-J., Kim, J.-S., Park, E. S., Lee, J.-S., Lin, Q., Langley, R. R., Maya, M., He, J., Kim, S.-W., Weihua, Z., Balasubramanian, K., Fan, D., Mills, G. B., Hung, M.-C., & Fidler, I. J. (2011). Astrocytes Upregulate Survival Genes in Tumor Cells and Induce Protection from Chemotherapy 1. *Neoplasia*, *13*, 286–298. https://doi.org/10.1593/neo.11112

Klemm, F., Maas, R. R., Bowman, R. L., Kornete, M., Soukup, K., Nassiri, S., Brouland, J. P., Iacobuzio-Donahue, C. A., Brennan, C., Tabar, V., Gutin, P. H., Daniel, R. T., Hegi, M. E., & Joyce, J. A. (2020). Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell*, *181*(7), 1643-1660.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.007

Knuutinen, O., Kuitunen, H., Alahuhta, S., Isokangas, J. M., Sonkajärvi, E., Turpeenniemi-Hujanen, T., & Kuittinen, O. (2018). Case Report: Chemotherapy in Conjunction With Blood–Brain Barrier Disruption for a Patient With Germ Cell Tumor With Multiple Brain Metastases. *Clinical Genitourinary Cancer*, *16*(5), e993–e996. https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.05.005

*Kolenda, T., Kapałczyńska, M., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2016). *State of the art paper 2D and 3D cell cultures-a comparison of different types of cancer cell cultures*. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743

Kondapaneni, R. V., & Rao, S. S. (2020). Matrix stiffness and cluster size collectively regulate dormancy versus proliferation in brain metastatic breast cancer cell clusters. *Biomaterials Science*, *8*(23), 6637–6646. https://doi.org/10.1039/D0BM00969E

Kondapaneni, R. V., Warren, R., & Rao, S. S. (2022). Low dose chemotherapy induces a dormant state in brain metastatic breast cancer spheroids. *AIChE Journal*, *68*(12). https://doi.org/10.1002/aic.17858

Krbal, L., Soukup, J., John, S., & Hanusova, V. (2017). Derivation and basic characterization of colorectal carcinoma primary cell lines. *Biomedical Papers*, *161*(4), 360–368. https://doi.org/10.5507/bp.2017.040

*Krishnaswamy, V. R., Amit Benbenishty, ·, Blinder, P., & Sagi, I. (2019). *Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights*. *76*, 3229–3248. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03182-6

Kuo, M.-H., Chang, W.-W., Yeh, B.-W., Chu, Y.-S., Lee, Y.-C., & Lee, H.-T. (2019). *Glucose Transporter 3 Is Essential for the Survival of Breast Cancer Cells in the Brain*. https://doi.org/10.3390/cells8121568

Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, *501*. https://doi.org/10.1038/nature12517

Le Rhun, E., Guckenberger, M., Smits, M., Dummer, R., Bachelot, T., Sahm, F., Galldiks, N., De Azambuja, E., & Berghoff, A. S. (2021). EANOeESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with brain metastasis from solid tumours 5 behalf of the EANO Executive Board and ESMO Guidelines Committee. *P. Wesseling*, *19*. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.07.016

Lee, C.-H., Gyu Kim, D., Wook Kim, J., Ho Han, J., Hwy Kim, Y., Park, C.-K., Kim, C.-Y., Ha Paek, S., & Jung, H.-W. (2013). *The role of surgical resection in the management of brain metastasis: a 17-year longitudinal study*. https://doi.org/10.1007/s00701-013-1619-y

Lee, H. J., Hanibuchi, M., Kim, S.-J., Yu, H., Kim, M. S., He, J., Langley, R. R., Lehembre, F., Regenass, U., & Fidler, I. J. (2015). *Treatment of experimental human breast cancer and lung cancer brain metastases in mice by macitentan, a dual antagonist of endothelin receptors, combined with paclitaxel*. https://doi.org/10.1093/neuonc/now037

Li, B., Wang, C., Zhang, Y., Zhao, X. Y., Huang, B., Wu, P. F., Li, Q., Li, H., Liu, Y. S., Cao, L. Y., Dai, W. M., Fang, W. G., Shang, D. S., Cao, L., Zhao, W. D., & Chen, Y. H. (2013). Elevated PLGF contributes to small-cell lung cancer brain metastasis. *Oncogene*, *32*(24), 2952–2962. https://doi.org/10.1038/onc.2012.313

Li, J., Zhu, H., Sun, L., Xu, W., & Wang, X. (2019). Prognostic value of site-specific metastases in lung cancer: A population based study. *Journal of Cancer*, *10*(14), 3079–3086. https://doi.org/10.7150/jca.30463

Lim, M., Fletcher, N. L., Saunus, J. M., McCart Reed, A. E., Chittoory, H., Simpson, P. T., Thurecht, K. J., & Lakhani, S. R. (2023). Targeted Hyperbranched Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin in Breast Cancer Brain Metastasis. *Molecular Pharmaceutics*. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.3C00558

Linskey, M. E., Andrews, D. W., Asher, A. L., Burri, S. H., Kondziolka, D., Robinson, P. D., Ammirati, M., Cobbs, C. S., Gaspar, L. E., Loeffler, J. S., McDermott, M., Mehta, M. P., Mikkelsen, T., Olson, J. J., Paleologos, N. A., Patchell, R. A., Ryken, T. C., & Kalkanis, S. N. (2010). The role of stereotactic radiosurgery in the management of patients with newly diagnosed brain metastases: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. In *Journal of Neuro-Oncology* (Roč. 96, Číslo 1, s. 45–68). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/s11060-009-0073-4

Liu, Q., Zhang, Z., Liu, Y., Cui, Z., Zhang, T., Li, Z., & Ma, W. (2018). Cancer cells growing on perfused 3D collagen model produced higher reactive oxygen species level and were more resistant to cisplatin compared to the 2D model. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*, *16*(3), 144–150. https://doi.org/10.1177/2280800018764763

Liu, W., Song, J., Du, X., Zhou, Y., Li, Y., Li, R., Lyu, L., He, Y., Hao, J., Ben, J., Wang, W., Shi, H., & Wang, Q. (2019). AKR1B10 (Aldo-keto reductase family 1 B10) promotes brain metastasis of lung cancer cells in a multi-organ microfluidic chip model. *Acta Biomaterialia*, *91*, 195–208. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.04.053

Liu, Y., Lv, J., Liang, X., Yin, X., Zhang, L., Chen, D., Jin, X., Fiskesund, R., Tang, K., Ma, J., Zhang, H., Dong, W., Mo, S., Zhang, T., Cheng, F., Zhou, Y., Xie, J., Wang, N., & Huang, B. (2018). *Tumor Biology and Immunology Fibrin Stiffness Mediates Dormancy of Tumor-Repopulating Cells via a Cdc42-Driven Tet2 Epigenetic Program*. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3719

*Ludmila Hynková, M., Šlampa, P., & Jančálek, R. (2016). *Radioterapie v léčbě mozkových metastáz*. www.neurologiepropraxi.cz/Neurol.praxi2016;17

*Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). *Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy*. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045

Mehta, M. P., Wang, D., Wang, F., Kleinberg, L., Brade, A., Robins, H. I., Turaka, A., Leahy, T., Medina, D., Xiong, H., Mostafa, N. M., Dunbar, M., Zhu, M., Qian, J., Holen, K., Giranda, V., & Curran, W. J. (2015). Veliparib in combination with whole brain radiation therapy in patients with brain metastases: results of a phase 1 study. *Journal of Neuro-Oncology*, *122*(2), 409–417. https://doi.org/10.1007/S11060-015-1733-1/FIGURES/4

Mengue, L., Bertaut, A., Mbus, L. N., Doré, M., Ayadi, M., Clément-Colmou, K., Carrie, C., Laude, C., Tanguy, R., Blanc, J., & Sunyach, M.-P. (2020). *Brain metastases treated with hypofractionated stereotactic radiotherapy: 8 years experience after Cyberknife installation*. https://doi.org/10.1186/s13014-020-01517-3

Meuwissen, R., Linn, S. C., Linnoila, R. I., Zevenhoven, J., Mooi, W. J., & Berns, A. (2003). *Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model*.

Misje Mathiisen, T., Lehre, K. P., Danbolt, N. C., & Ottersen, O. P. (2010). *The Perivascular Astroglial Sheath Provides a Complete Covering of the Brain Microvessels: An Electron Microscopic 3D Reconstruction*. https://doi.org/10.1002/glia.20990

Nagelkerke, A., Bussink, J., Sweep, F. C. G. J., & Span, P. N. (2013). Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: How to go three-dimensional. *Analytical Biochemistry*, *437*(1), 17–19. https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.02.004

Nagpal, A., Redvers, R. P., Ling, X., Ayton, S., Fuentes, M., Tavancheh, E., Diala, I., Lalani, A., Loi, S., David, S., Anderson, R. L., Smith, Y., Merino, D., Denoyer, D., & Pouliot, N. (2019). Neoadjuvant neratinib promotes ferroptosis and inhibits brain metastasis in a novel syngeneic model of spontaneous HER2+ve breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/s13058-019-1177-1

Nakagawa, S., Deli, R. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Gnes Kittel, A. ´, Tanaka, K., & Niwa, M. (2009). *A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes*. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002

Narkhede, A. A., Crenshaw, J. H., Crossman, D. K., Shevde, L. A., & Rao, S. S. (2020). An in vitro hyaluronic acid hydrogel based platform to model dormancy in brain metastatic breast cancer cells. *Acta Biomaterialia*, *107*, 65–77. https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2020.02.039

Neal, J. T., Li, X., Zhu, J., Giangarra, V., Grzeskowiak, C. L., Ju, J., Liu, I. H., Chiou, S. H., Salahudeen, A. A., Smith, A. R., Deutsch, B. C., Liao, L., Zemek, A. J., Zhao, F., Karlsson, K., Schultz, L. M., Metzner, T. J., Nadauld, L. D., Tseng, Y. Y., … Kuo, C. J. (2018). Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*, *175*(7), 1972-1988.e16. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.021

Noda, R., Kawashima, M., Segawa, M., Tsunoda, S., Inoue, T., & Akabane, A. (2023). Fractionated versus staged gamma knife radiosurgery for mid-to-large brain metastases: a propensity score-matched analysis. *Journal of Neuro-Oncology*, *164*(1), 87–96. https://doi.org/10.1007/s11060-023-04374-8

*Ostrom, Q. T., Wright, C. H., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). *Brain metastases: epidemiology. Metastatic Disease of the Nervous System, 27–42.* doi:10.1016/b978-0-12-811161-1.00002-5

Parakh, S., Park, J. J., Mendis, S., Rai, R., Xu, W., Lo, S., Drummond, M., Rowe, C., Wong, A., Mcarthur, G., Haydon, A., Andrews, M. C., Cebon, J., Guminski, A., Kefford, R. F., Long, G. V, Menzies, A. M., Klein, O., & Carlino, M. S. (2017). *Efficacy of anti-PD-1 therapy in patients with melanoma brain metastases*. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.142

Park, E.-J., Zhang, Y.-Z., Vykhodtseva, N., & McDannold, N. (2012). *Ultrasound-mediated blood-brain/blood-tumor barrier disruption improves outcomes with trastuzumab in a breast cancer brain metastasis model*. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.09.007

Peng, W., zhu, R., Zhou, S., Mirzaei, P., & Mechref, Y. (2019). Integrated Transcriptomics, Proteomics, and Glycomics Reveals the Association between Up-regulation of Sialylated N-glycans/Integrin and Breast Cancer Brain Metastasis. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-53984-8

Peters, S., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Gadgeel, S., Ahn, J. S., Kim, D.-W., Ou, S.-H. I., Pérol, M., Dziadziuszko, R., Rosell, R., Zeaiter, A., Mitry, E., Golding, S., Balas, B., Noe, J., Morcos, P. N., & Mok, T. (2017). Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK -Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *377*(9), 829–838. https://doi.org/10.1056/nejmoa1704795

Pradhan, S., & Slater, J. H. (2019). *Tunable hydrogels for controlling phenotypic cancer cell states to model breast cancer dormancy and reactivation*. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.022

Procissi, D., Jannetti, S. A., Zannikou, M., Zhou, Z., McDougald, D., Kanojia, D., Zhang, H., Burdett, K., Vaidyanathan, G., Zalutsky, M. R., & Balyasnikova, I. V. (2022). Low-level whole-brain radiation enhances theranostic potential of single-domain antibody fragments for human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2)-positive brain metastases. *Neuro-Oncology Advances*, *4*(1). https://doi.org/10.1093/noajnl/vdac135

*Quaranta, V., & Linkous, A. (2022). Organoids as a Systems Platform for SCLC Brain Metastasis. *Frontiers in Oncology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.881989

Queirolo, P., Spagnolo, F., Antonio Ascierto, P., Simeone, E., Marchetti, P., Scoppola, A., Del Vecchio, M., Di Guardo, L., Maio, M., Maria Di Giacomo, A., Antonuzzo, A., Cognetti, F., Ferraresi, V., Ridolfi, L., Guidoboni, M., Guida, M., Pigozzo, J., Chiarion Sileni, V., Queirolo, P., … Pigozzo Á Chiarion Sileni, J. V. (2014). Efficacy and safety of ipilimumab in patients with advanced melanoma and brain metastases. *J Neurooncol*, *118*, 109–116. https://doi.org/10.1007/s11060-014-1400-y

Rao, S. S., Bushnell, G. G., Azarin, S. M., Spicer, G., Aguado, B. A., Stoehr, J. R., Jiang, E. J., Backman, V., Shea, L. D., & Jeruss, J. S. (2016). *Enhanced Survival with Implantable Scaffolds That Capture Metastatic Breast Cancer Cells In Vivo*. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2106

Reddy, J. P., Dawood, S., Mitchell, M., Debeb, B. G., Bloom, E., Gonzalez-Angulo, A. M., Sulman, E. P., Buchholz, T. A., & Woodward, W. A. (2015). Antiepileptic drug use improves overall survival in breast cancer patients with brain metastases in the setting of whole brain radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, *117*, 308–314. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.10.009

Ryken, T. C., McDermott, M., Robinson, P. D., Ammirati, M., Andrews, D. W., Asher, A. L., Burri, S. H., Cobbs, C. S., Gaspar, L. E., Kondziolka, D., Linskey, M. E., Loeffler, J. S., Mehta, M. P., Mikkelsen, T., Olson, J. J., Paleologos, N. A., Patchell, R. A., & Kalkanis, S. N. (2010). The role of steroids in the management of brain metastases: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. In *Journal of Neuro-Oncology* (Roč. 96, Číslo 1, s. 103–114). https://doi.org/10.1007/s11060-009-0057-4

Saunus, J. M., Quinn, M. C. J., Patch, A. M., Pearson, J. V., Bailey, P. J., Nones, K., McCart Reed, A. E., Miller, D., Wilson, P. J., Al-Ejeh, F., Mariasegaram, M., Lau, Q., Withers, T., Jeffree, R. L., Reid, L. E., Da Silva, L., Matsika, A., Niland, C. M., Cummings, M. C., … Lakhani, S. R. (2015). Integrated genomic and transcriptomic analysis of human brain metastases identifies alterations of

potential clinical significance. *Journal of Pathology*, *237*(3), 363–378. https://doi.org/10.1002/path.4583

Savchuk, S., Gentry, K., Wang, W., Carleton, E., Yalçın, B., Liu, Y., Pavarino, E. C., LaBelle, J., Toland, A. M., Woo, P. J., Qu, F., Filbin, M. G., Krasnow, M. A., Sabatini, B. L., Sage, J., Monje, M., & Venkatesh, H. S. (2023). Neuronal-Activity Dependent Mechanisms of Small Cell Lung Cancer Progression. *bioRxiv : the preprint server for biology*. https://doi.org/10.1101/2023.01.19.524430

Serizawa, T., Hirai, T., Nagano, O., Higuchi, Y., Matsuda, S., Ono, J., & Saeki, N. (2010). Gamma knife surgery for 1-10 brain metastases without prophylactic whole-brain radiation therapy: Analysis of cases meeting the Japanese prospective multi-institute study (JLGK0901) inclusion criteria. *Journal of Neuro-Oncology*, *98*(2), 163–167. https://doi.org/10.1007/s11060-010-0169-x

Sevenich, L., Bowman, R. L., Mason, S. D., Quail, D. F., Rapaport, F., Elie, B. T., Brogi, E., Brastianos, P. K., Hahn, W. C., Holsinger, L. J., Massagué, J., Leslie, C. S., & Joyce, J. A. (2014). Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nature Cell Biology*, *16*(9), 876–888. https://doi.org/10.1038/ncb3011

Shabalina, E. Y., Skorova, E. Y., Chudakova, D. A., Anikin, V. B., Reshetov, I. V., Mynbaev, O. A., & Petersen, E. V. (2021). The matrix-dependent 3D spheroid model of the migration of non-small cell lung cancer: a step towards a rapid automated screening. *Frontiers in Pharmacology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.610407

Shi, X., Cheng, Y., Wang, J., Chen, H., Wang, X., Li, X., Tan, W., & Tan, Z. (2020). 3D printed intelligent scaffold prevents recurrence and distal metastasis of breast cancer. *Issue 23 Theranostics*, *10*(23), 10652–10664. https://doi.org/10.7150/thno.47933

Shimizu, F., Sano, Y., Saito, K., Abe, M. A., Maeda, T., Haruki, H., & Kanda, T. (2012). Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochemical Research*, *37*(2), 401–409. https://doi.org/10.1007/s11064-011-0626-8

Shindorf, M. L., Jafferji, M. S., & Goff, S. L. (2020). Incidence of Asymptomatic Brain Metastases in Metastatic Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, *19*(4), 263–272. https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.09.002

Skarkova, V., Vitovcova, B., Matouskova, P., Manethova, M., Kazimirova, P., Skarka, A., Brynychova, V., Soucek, P., Vosmikova, H., & Rudolf, E. (2022). Role of N-Cadherin in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Chemosensitivity of Colon Carcinoma Cells. *Cancers*, *14*(20). https://doi.org/10.3390/cancers14205146

Sobottka, B., Pestalozzi, B., Fink, D., Moch, H., & Varga, Z. (2016). Similar lymphocytic infiltration pattern in primary breast cancer and their corresponding distant metastases. *OncoImmunology*, *5*(6). https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1153208

Sperduto, P. W., Mesko, S., Li, J., Cagney, D., Aizer, A., Lin, N. U., Nesbit, E., Kruser, T. J., Chan, J., Braunstein, S., Lee, J., Kirkpatrick, J. P., Breen, W., Brown, P. D., Shi, D., Shih, H. A., Soliman, H., Sahgal, A., Shanley, R., … Mehta, M. P. (2020). Beyond an Updated Graded Prognostic Assessment (Breast GPA): A Prognostic Index and Trends in Treatment and Survival in Breast Cancer Brain Metastases From 1985 to Today. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *107*(2), 334–343. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.01.051

Tehranian, C., Fankhauser, L., Harter, P. N., Ratcliffe, C. D. H., Zeiner, P. S., Messmer, J. M., Hoffmann, D. C., Frey, K., Westphal, D., Ronellenfitsch, M. W., Sahai, E., Wick, W., Karreman, M. A., & Winkler, F. (2022). The PI3K/Akt/mTOR pathway as a preventive target in melanoma brain metastasis. *Neuro-Oncology*, *24*(2), 213–225. https://doi.org/10.1093/neuonc/noab159

*Thakor, J., Ahadian, S., Niakan, A., Banton, E., Nasrollahi, F., Hasani-Sadrabadi, M. M., & Khademhosseini, A. (2020). *Engineered hydrogels for brain tumor culture and therapy*. *3*, 203–226. https://doi.org/10.1007/s42242-020-00084-6

Thomas, N. J., Myall, N. J., Sun, F., Patil, T., Mushtaq, R., Yu, C., Sinha, S., Pollom, E. L., Nagpal, S., Camidge, D. R., Rusthoven, C. G., Braunstein, S. E., Wakelee, H. A., & McCoach, C. E. (2022). Brain Metastases in EGFR- and ALK-Positive NSCLC: Outcomes of Central Nervous System-Penetrant Tyrosine Kinase Inhibitors Alone Versus in Combination With Radiation. *Journal of Thoracic Oncology*, *17*(1), 116–129. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.08.009

*Tuveson, D., & Clevers, H. (2019). Cancer modeling meets human organoid technology. *Science*, *364*(6444), 952–955. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAW6985

*Valiente, M., van Swearingen, A. E. D., Anders, C. K., Bairoch, A., Boire, A., Bos, P. D., Cittelly, D. M., Erez, N., Ferraro, G. B., Fukumura, D., Gril, B., Herlyn, M., Holmen, S. L., Jain, R. K., Joyce, J. A., Lorger, M., Massague, J., Neman, J., Sibson, N. R., … Winkler, F. (2020). Brain metastasis cell lines panel: A public resource of organotropic cell lines. *Cancer Research*, *80*(20), 4314–4323. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0291

Vare slija, D., Priedigkeit, N., ıs Fagan, A., Purcell, S., Cosgrove, N., O, P. J., Ward, E., ead Cocchiglia, S., Hartmaier, R., Castro, C. A., Zhu, L., Tseng, G. C., Lucas, P. C., Puhalla, S. L., Brufsky, A. M., Hamilton, R. L., Mathew, A., Leone, J. P., Basudan, A., … Young, L. S. (2019). *Transcriptome Characterization of Matched Primary Breast and Brain Metastatic Tumors to Detect Novel Actionable Targets*. https://doi.org/10.1093/jnci/djy110

Vasudevan, J., Teck Lim, C., Fernandez, J. G., Vasudevan, J., & Lim, C. T. (2020). *Cell Migration and Breast Cancer Metastasis in Biomimetic Extracellular Matrices with Independently Tunable Stiffness*. https://doi.org/10.1002/adfm.202005383

Villodre, E. S., Hu, X., Eckhardt, B. L., Larson, R., Huo, L., Yoon, E. C., Gong, Y., Song, J., Liu, S., Ueno, N. T., Krishnamurthy, S., Pusch, S., Tripathy, D., Woodward, W. A., & Debeb, B. G. (2021). *NDRG1 in Aggressive Breast Cancer Progression and Brain Metastasis*. https://doi.org/10.1093/jnci/djab222

Vo, T., Carulli, D., Ehlert, E. M. E., Kwok, J. C. F., Dick, G., Mecollari, V., Moloney, E. B., Neufeld, G., De Winter, F., Fawcett, J. W., & Verhaagen, J. (2013). *The chemorepulsive axon guidance protein semaphorin3A is a constituent of perineuronal nets in the adult rodent brain*. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.009

Wang, H. M., Zhang, C. Y., Peng, K. C., Chen, Z. X., Su, J. W., Li, Y. F., Li, W. F., Gao, Q. Y., Zhang, S. L., Chen, Y. Q., Zhou, Q., Xu, C., Xu, C. R., Wang, Z., Su, J., Yan, H. H., Zhang, X. C., Chen, H. J., Wu, Y. L., & Yang, J. J. (2023). Using patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: A real-world study. *Cell Reports Medicine*, *4*(2). https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100911

Wang, J., Daphu, I., Pedersen, P. H., Miletic, H., Hovland, R., Mørk, S., Bjerkvig, R., Tiron, C., McCormack, E., Micklem, D., Lorens, J. B., Immervoll, H., & Thorsen, F. (2011). A novel brain metastases model developed in immunodeficient rats closely mimics the growth of metastatic brain tumours in patients. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *37*(2), 189–205. https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.2010.01119.X

Wang, J., Peng, W., Yu, A., Fokar, M., & Mechref, Y. (2022). Comparative Transcriptomics and Proteomics of Cancer Cell Lines Cultivated by Physiological and Commercial Media. *Biomolecules*, *12*(11). https://doi.org/10.3390/biom12111575

Xu, H., Li, Z., Yu, Y., Sizdahkhani, S., Ho, W. S., Yin, F., Wang, L., Zhu, G., Zhang, M., Jiang, L., Zhuang, Z., & Qin, J. (2016). A dynamic in vivo-like organotypic blood-brain barrier model to probe metastatic brain tumors OPEN. *Nature Publishing Group*. https://doi.org/10.1038/srep36670

Yoneda, T., Williams, P. J., Hiraga, T., Niewolna, M., & Nishimura, R. (2001). A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, *16*(8), 1486–1495. https://doi.org/10.1359/JBMR.2001.16.8.1486

Yoon, B. C., Saad, A. F., Rezaii, P., Wintermark, M., Zaharchuk, G., & Iv, M. (2018). Evaluation of Thick-Slab Overlapping MIP Images of Contrast-Enhanced 3D T1-Weighted CUBE for Detection

of Intracranial Metastases: A Pilot Study for Comparison of Lesion Detection, Interpretation Time, and Sensitivity with Nonoverlapping CUBE MIP, CUBE, and Inversion-Recovery-Prepared Fast-Spoiled Gradient Recalled Brain Volume. *American Journal of Neuroradiology*, *39*(9), 1635–1642. https://doi.org/10.3174/AJNR.A5747

*Yuzhalin, A. E., & Yu, D. (2023). Critical functions of extracellular matrix in brain metastasis seeding. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Roč. 80, Číslo 10). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s00018-023-04944-z

Zahib, I. R., Md Tahir, P., Talib, M., Mohamad, R., Humaira Alias, A., & Lee, H. (2020). *Effects of degree of substitution and irradiation doses on the properties of hydrogel prepared from carboxymethyl-sago starch and polyethylene glycol*. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117224

*Zimmermann, D. R., María, ·, & Dours-Zimmermann, T. (2008). Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol*, *130*, 635–653. https://doi.org/10.1007/s00418-008-0485-9

Sekundární citace jsou označeny *