UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

3D HETEROTYPICKÉ MNOHOBUNĚČNÉ NÁDOROVÉ MODELY PRO EXPERIMENTÁLNÍ *IN VITRO* STUDIUM FOTODYNAMICKÉ TERAPIE

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Magdaléna Kozlíková

Hradec Králové 2025

Viktorie Fikrová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Magdaléně Kozlíkové své práce za čas věnovaný mé práci a za nápomocné rady při jejím psaní.

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

V Hradci Králové 15. 5. 2025

1. Obsah

1. Obsah 6
2. Úvod 8
3. Seznam zkratek 9
4. Fotodynamická terapie (PDT) 11
   4.1. Mechanismus působení 11
   4.2. Fotosensitizéry (PS) 13
      4.2.1. PS první generace 13
      4.2.2. PS druhé generace 14
      4.2.3. PS třetí generace 14
   4.3. Zdroje světelného záření 14
   4.4. Výhody a nevýhody fotodynamické terapie 15
5. 3D Kultury 16
   5.1. Mikroprostředí 3D kultur 16
   5.2. Metody kultivace s vnější oporou 17
      5.2.1. Podpora na bázi hydrogelů 17
      5.2.2. Podpora na bázi tvrdých polymerních materiálů 18
      5.2.3. Vláknité formy podpory 18
   5.3. Metody kultivace bez vnější opory 18
      5.3.1. Metoda visuté kapky 19
      5.3.2. Magnetická levitace 19
      5.3.3. Nepřilnavé destičky a metoda nuceného vznášení 19
      5.3.4. Nucená agregace do mikrotěles 20
   5.4. Limity, omezení a nevýhody 3D kultivace 21
   5.5. Mnohobuněčné nádorové sféroidy (MCTS) 22
      5.5.1. Kultivace a vliv buněčné linie 23
6. 3D heterotypické modely 24
   6.1. Sféroidy a organoidy 24
   6.2. Nádorové mikroprostředí 26
      6.2.1. Nádorově asociované fibroblasty 26
      6.2.2. Imunitní buňky 26
      6.2.3. Vaskulární endoteliální buňky 27
      6.2.4. Extracelulární matrix (ECM) 28
   6.3. Buněčné interakce mezi nádorovými buňkami a dalšími typy buněk 28
7. 3D kultury a PDT 30

7.1. Homotypické kultury a PDT 30
7.2. Heterotypické kultury a PDT 31
8. Závěr 33
9. Literatura 34

2. Úvod

Nádorová onemocnění jsou jedny z nejzávažnějších onemocnění, co se týče morbidity i mortality. Jedním z důležitých kroků v hledání nové vhodné terapie je mechanismus působení a testování na vhodných *in vitro* a následně také *in vivo* modelech, které budou co nejvíce odpovídat skutečnosti v lidském organismu. Tato práce je zaměřená na fotodynamickou terapii a zahrnuje její základní princip. V dalších částech se zabývá kultivací buněčných modelů, a to zejména trojrozměrných buněčných modelů včetně heterotypických. Poslední kapitola práce je zpracována z experimentálních prací, v nichž se protínala tématika fotodynamické terapie a trojrozměrných buněčných modelů.

3. Seznam zkratek

AGuIX – Nanočástice na bázi polysilanolu

ALA – kyselina 5-aminolevulinová

CAF – nádorově asociované fibroblasty

DARPins – Proteiny s ankyrinovými repeticemi

ECM – Extracelulární matrix

EGF – Epidermální růstový faktor

EpCAM – Epitelová adhezní molekula

FGF – Fibroblastový růstový faktor

GIC – Gliomové iniciační buňky

HGF – Hepacytární růstový faktor

HIF – Faktory indukované hypoxií

HpD – Derivát hematoporfirinu

IFP – Tlak intersticiální tekutiny

IL-8 – Interleukin-8

MCTS – Mnohobuněčné nádorové sféroidy

PDT – Fotodynamická terapie

PEG – Polyethylenglykol

PDGF – Od destiček odvozený růstový faktor

PS – Fotosenzitizér

SDF – 1 Ze stromálních buněk odvozený faktor

TAM – Makrofágy asociované s nádory

TGF – β1 Transformující růstový faktor β1

TME – Nádorové mikroprostředí

TPP – 5,10,15,20-tetrafenyl-21H,23H-porfirin

ULA – Destičky s velmi nízkou přilnavostí

VEGF – Vaskulární endotelový růstový faktor

VSV – Vir vezikulární stomatitidy

ZnPcS4 – Tetrasulfonový zinečnatý ftalocyanin

4. Fotodynamická terapie (PDT)

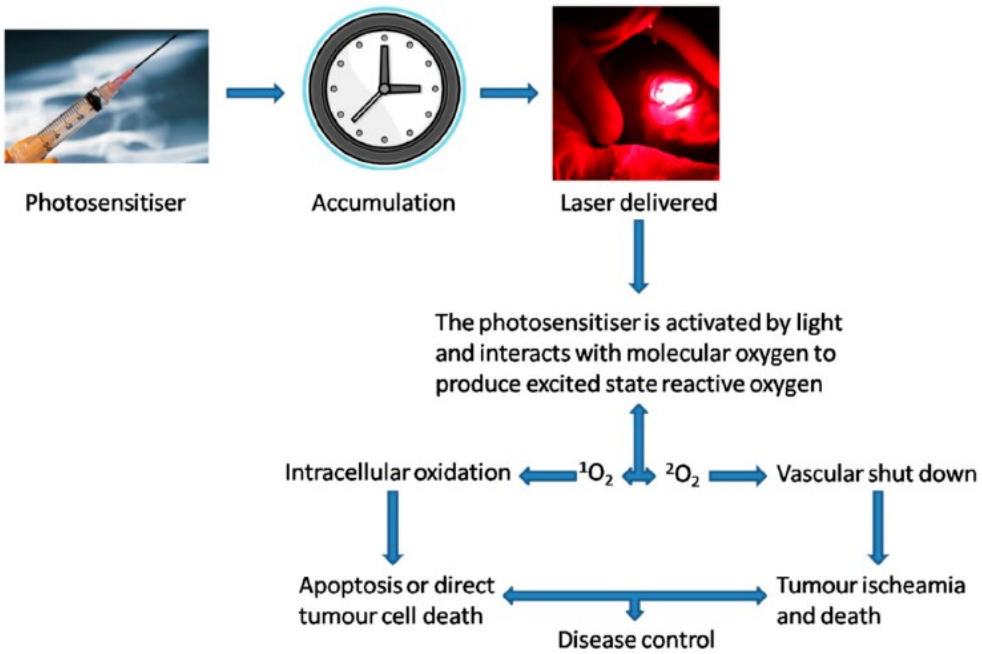
Fotochemoterapie nádorových buněk se často nazývá fotodynamická terapie (PDT), kterou můžeme definovat jako podání fotosensitizéru, látky (tato látka může vyžadovat metabolickou přeměnu, tj. proléčivo), která se aktivuje světlem o určité vlnové délce, v důsledku čehož dojde k sérii procesů, které vedou k poškození tkání.

PDT je spojována s řadou látek odvozených porfyrinů zahrnujících hematoporfyrin, protoporfyrin IX a jejich cytotoxickým účinkem po ozáření světlem určité vlnové délky. Důležitým objevem byl Schwartzův derivát hematoporfyrinu (HpD), který získal zpracováním hematoporfyrinu s kyselinou sírovou a kyselinou octovou, následnou směs dále upravoval, až se dostal k výslednému HpD. Schwartz následně spolupracoval s Lipsonem, který působil na Mayo Clinic, a přesvědčil jej, aby svou pozornost upřel od hematoporfyrinu k HpD. Lipson prokázal, že HpD je v akumulaci do nádorových buněk účinnější než hematoporfyrin, a to i za použitím výrazně menších dávek [1].

4.1. Mechanismus působení

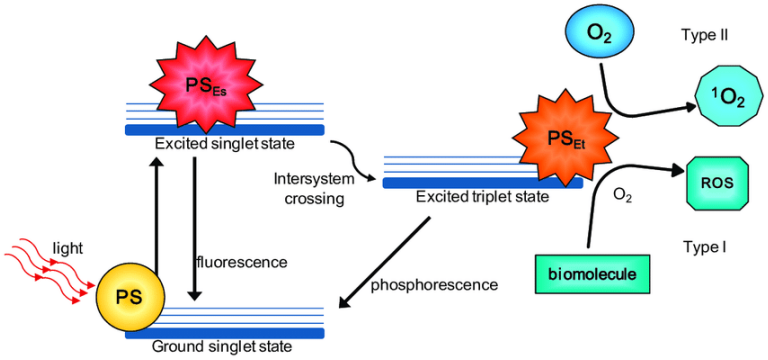
PDT je neinvazivní metoda užívaná při léčbě nádorů postavená na třech základních pilířích a těmi jsou fotosensitizér (PS), světlo a molekulární kyslík [2], [3], [4][5].

Nejprve se aplikuje PS, to může probíhat buď lokálně nebo systémově, následuje časová prodleva, kdy se PS lokalizuje v patologické tkáni (DLI z angl. *drug-to-light iterval*), to může být způsobeno nedostatečnou lymfatickou drenáží nádoru a zvýšenou propustností malformovaných cév. PS je přijímán jak zdravými, tak i maligními buňkami, ovšem solidní nádory jsou často specifické neuspořádaným cévním zásobením, kde je endoteliální výstelka defektní, to zvyšuje propustnost a tím i množství PS, které jí proniká. A kvůli špatné lymfatické drenáži dojde k delšímu zadržování. Dochází k jevu, kdy je koncentrace PS v maligních tkáních vyšší než ve zdravých. Excitace PS v buňkách vede k oxidačnímu stresu a následně k buněčné smrti. Dalším způsobem může být i cílení na cévní zásobení nádoru, který je tak zbaven přívodu kyslíku a dalších živin, je zabráněno další angiogenezi a tím i další proliferaci, následkem je iniciace zánětlivé či imunitní reakce zaměřené na reziduální patologickou tkáň [2], [3], [4].



Obrázek 1 Schéma použití fotodynamické terapie. Nejprve je podán fotosenzitizér, po časovém odstupu je aplikováno světlo pomocí laseru, tím se fotosenzitizér aktivuje a začne interagovat s molekulami kyslíku, touto interakcí vzniká singletový kyslík. Následně mohou nastat dvě situace: v prvním případě singletový kyslík způsobí intracelulární oxidaci, ta vede k přímé smrti nádorových buněk; v druhém případě dojde uzávěru cév zásobujících nádor, tím způsobí nádorovou ischemii, která vede k buněčné smrti[4].

V dalším kroku je aplikováno světlo o konkrétní vlnové délce, PS absorbuje energii záření a přejde do excitovaného singletového stavu. Přebytečná energie se uvolní ve formě tepla nebo vyzářením fotonu (fluorescence) a molekula se vrátí do základního energetického stavu (lze využít např. pro diagnostické účely). Účinné PS však mohou přestoupit do excitovaného tripletového stavu, ze kterého je schopen přejít na základní stav vyzářením fotonu (fosforescence), nebo tuto energii ztratí srážkou s jinými molekulami. Srážkami s organickými substráty vznikají reaktivní molekuly, např. radikály (reakce 2. typu). Přímou reakcí s molekulárním kyslíkem (v základním energetickém stavu) vzniká singletový kyslík (reakce 1. typu) [2], [3], [4], [5], [6].



Obrázek 2 Jablonského diagram – excitace fotosensitizéru (PS) světlem určité vlnové délky a další návazné děje. PS – fotosensitizér, PS_{Es} – excitovaná singletový stav PS, PS_{Et} – excitovaný tripletový stav PS, $^1O_2$ – singletový kyslík, ROS – reaktivní formy kyslíku [7].

Předpokládá se, že většina cytotoxického účinku je dána zásluhou reaktivních forem kyslíku. Singletový kyslík je schopen difúze z místa vzniku do vzdálenosti cca 20 nm, proto je PDT považována teoreticky za vysoce specifickou a kontrolovatelnou terapii s minimálním systémovým zásahem.

Účinek PDT je ovlivněn několika faktory: typem PS, jeho koncentrací PS v patologické tkáni, lokalizací PS v buňce, dávkou světla a dostupností kyslíku. Výslednou reakcí je ischemická a přímá smrt nádorových buněk patologické tkáně. PS hromadící se v blízkosti mitochondrií, způsobují permeabilizaci membrány mitochondrií, to vede k uvolnění cytochromu c a následně k aktivaci apoptózy, která je zprostředkovaná kaspázami. Druhou možností je nekróza, která může vzniknout v důsledku vyšších dávek PDT a poškozením složek apoptických drah, nebo pokud je PS lokalizován v plazmatické membráně, to má za důsledek vylití buněčného obsahu a následnou zánětlivou reakci [2], [3], [4].

4.2. Fotosensitizéry (PS)

4.2.1. PS první generace

Prvním klinicky schváleným PS byl porfimer sodný (Photofin®), který je používán např. k léčbě nádorů plic, jícnu, žaludku, močového měchýře a děložního čípku. Absorpční maximum je 405 nm, ovšem světlo této vlnové délky proniká do tkání velmi špatně. Další možností je excitace světlem o vlnové délce 630 nm, tato vlnová délka proniká tkání lépe, ale absorbance porfimeru sodného je při této vlnové délce slabá, z tohoto důvodu je hloubka účinku omezena na cca 0,5 cm. Další nevýhodou je přetrvávající

fotosensitivita kůže způsobená vysokou akumulací v kůži a dlouhým poločasem rozpadu, může přetrvávat i po mnoho týdnů [2], [3], [4].

4.2.2. PS druhé generace

PS druhé generace vynikají oproti první generaci omezenou nežádoucí fotosensitivitou (rychlejší vylučování z těla), absorpčním maximem ve vyšších vlnových délkách, a díky tomu i větší hloubkou účinku, lepší selektivitou vůči nádorům a většími výtěžky singletového kyslíku. Nedostatkem PS této generace je mnohdy špatná rozpustnost ve vodě, a tím pádem jejich omezené užití pro intravenózní aplikace. Do této generace patří kyselina 5-aminolevulinová (ALA), která je přirozeným prekurzorem v biosyntetické dráze hemu, ta se převádí na endogenní PS protoporfyrin IX [2], [3], [4]

4.2.3. PS třetí generace

Jedním z nejdůležitějších cílů PS třetí generace je zvýšení afinity a selektivity PS k nádorovým buňkám, a tím minimalizovat škodlivé účinky na zdravou tkáň. Ke zvýšení účinnosti se používají různé modifikace, které mají za cíl zlepšit účinnost a přesnost PDT. Jedním z těchto případů je konjugace PS s LDL lipoproteiny – zakládá na skutečnosti, že nádorové buňky potřebují k syntéze buněčné stěny velké množství cholesterolu, tím pádem mají na svém povrchu i velké množství LDL receptorů, díky této vlastnosti lze cílit PS více k nádorovým buňkám než k buňkám nemaligním, což zvyšuje účinnost PDT a minimalizuje účinek na zdravé tkáně [2].

4.3. Zdroje světelného záření

Jako zdroj světelného záření lze použít xenonové výbojky, LED zdroje (běžně užívané při dermatologických aplikacích), ovšem nejvhodnějším a nejlépe kontrolovatelným zdrojem jsou stále lasery [3], [4].

Monochromatické a koherentní laserové světlo je možno vést optickými kabely – tato skutečnost umožňuje zavedení světla do dutých orgánů či k hluboko uloženým nádorům. Preferovaným zdrojem světla se tak staly diodové lasery, výjimkou jsou dermatologické aplikace, tam je upřednostňováno nelaserový světelný zdroj (možnost ozářit větší plochu, jednoduchá konstrukce a nižší cena) [3], [4], [5].

4.4. Výhody a nevýhody fotodynamické terapie

U menších lézí vykazovala PDT lepší výsledky než u hlubších a větších lézi v porovnání s chirurgickým zákrokem. Pokud PDT srovnáváme s chemoterapii či radioterapií, tak se jeví jako účinná a bezpečná alternativa s nižší morbiditou. Další výhodou je nízká systémová toxicita PS [2], [3], [4], [6].

Jendou z nejčastějších nevýhod je poškození kůže v ošetřované oblasti, obzvlášť při nadměrném ozáření nebo u osob s vysokou fotosensitivitou, také mohou být pacienti nějakou dobu po zákroku citlivější na sluneční záření. Kůže v ošetřované oblasti může být nejen zarudnutá, projevovat šupinatění, otok či svědění. V místě ošetření hrozí zjizvení nebo změna zbarvení. Vedlejší účinky se mohou lišit v závislosti na typu onemocnění, oblasti léčby a také v závislosti na individuální reakci jedince [2], [4], [6].

5. 3D Kultury

2D buněčné kultury jsou jednovrstvé buněčné modely, mají nízké náklady, časovou náročnost a vysokou reprodukovatelnost. Nevýhodou tohoto buněčného modelu je, že umisťuje buňky do nepřirozeného prostředí, postrádá extracelulární matrix, a tím dostatečně nenapodobuje mikroprostředí tkání, přirozený vývoj buněk a tkání *in vivo*. Pokud se buňky v modelu nachází v monovrstvě, dochází k vystavení všech buněk modelu léčivu či jiné testované látce pro všechny buňky stejným způsobem a ve stejné dávce, tento jev se *in vivo* neděje a může být pro výzkum zavádějící [8], [9].

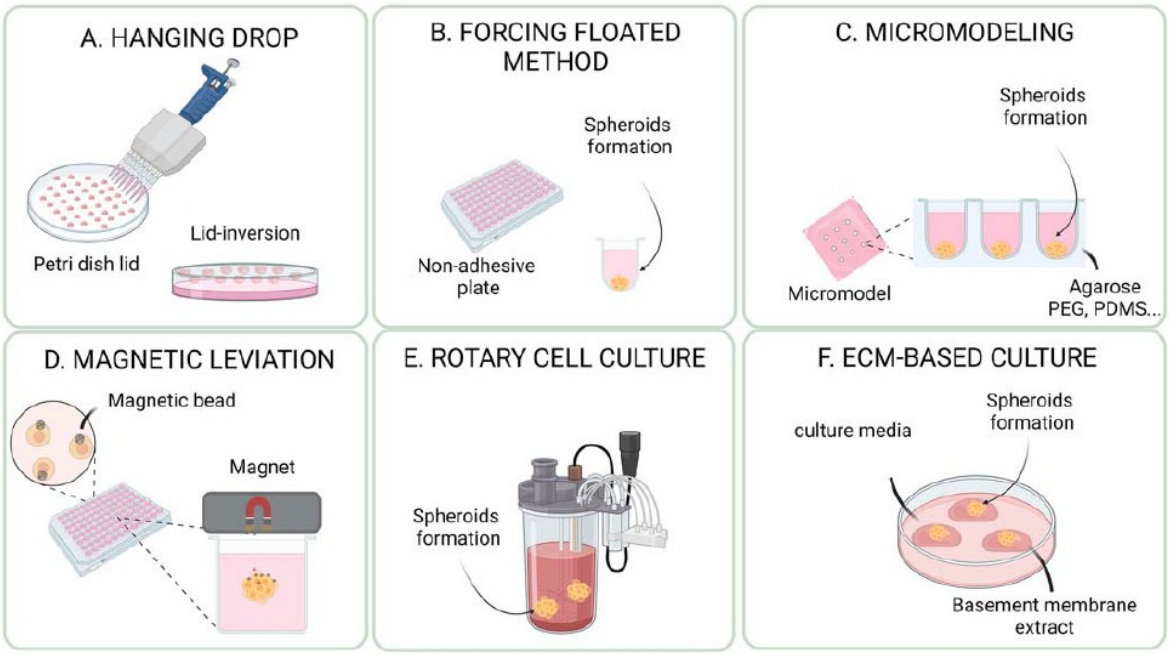
3D buněčná kultura více napodobuje prostředí podobné situaci *in vivo*. Umožňuje růst buněk ve třech rozměrech, stejně tak umožňuje buňkám interagovat s okolním prostředím. Buňky ve 3D modelech jsou v prostředí podobném lidskému tělu svým uspořádáním buněk, růstem či diferenciací a díky této skutečnosti vykazují podobné vlastnosti jako buňky lidského těla. Buňkám jsou poskytnuty živiny, kyslík a další potřebné látky, aby bylo vytvořeno prostředí, které je dostatečně biologicky odpovídající. Charakteristickým rysem 3D kultur je interakce mezi buňkami, interakce mezi buňkami a prostředím či parakrinní signalizace pomocí difúze buněčných sekretů. Tyto rysy u 2D buněčných kultur nenalezneme [10], [11].

5.1. Mikroprostředí 3D kultur

Na rozdíl od statických 2D kultur jsou 3D kultury dynamické povahy, což přináší komplikace při udržování optimálního kultivačního prostředí po delší dobu. Jako problémové se jeví okysličování, difúze živin a odstraňování odpadu v celé struktuře, proto byly vyvinuty mikrofluidní systémy a perfúzní bioreaktory, které pomáhají udržovat kultivační podmínky včetně kontroly nad teplotou a pH prostředí, a tím zajišťují dlouhodobou životaschopnost 3D modelů [12].

Volba konkrétních modelů pro 3D kultivaci zahrnuje: původ tkáně, zamýšlená aplikace a případně zda se jedná o kultivaci běžných buněk nebo zda jde o zaměření na konkrétní onemocnění. Modely můžeme rozdělit a to do dvou skupin. První jsou modely s oporou, kam patří podpora na bázi hydrogelů, podpora na bázi tvrdých polymerních materiálů nebo hydrofilní skleněná vlákna. Druhá skupina je bez opory, tam můžeme zařadit magnetickou levitaci, metodu visuté kapky, sféroidní mikrotitrační destičky

s povrchem s velmi nízkou přilnavostí nebo metoda nuceného vznášení, nucená aggregace do mikrotěles (mikrojader), rotační systém pro kultivaci buněk [13].



Obrázek 3 Schéma zobrazující hlavní metody pro kultivaci 3D modelů. A – metoda visuté kapky; B – metoda nuceného vznášení; C – mikromodeling v jamkách tvořených polymerním substrátem; D – magnetická levitace; E – rotační kultivace buněk; F – kultura založená na metodě s extracelulární matrix [13].

5.2. Metody kultivace s vnější oporou

3D opory pro buněčnou kultivaci nabízejí oproti kultivaci 2D, realističtější prostředí pro interakci i růst buněk. Tyto struktury mohou být vyrobeny z různých materiálů, tím pádem mohou mít různé vlastnosti. Nabízejí tak řízenou propustnost a pórovitost, chemické složení či mechanické vlastnosti, napodobující přirozené ECM (extracelulární matrix). Výroba těchto konstrukcí může zahrnovat různé techniky, za účelem specifických strukturních a mechanických vlastností, např. sušení mrazem využívá sublimaci k tvorbě porézního skeletu či elektrospinning k vytvoření vláknitých konstrukcí působením elektrostatických sil [12], [14].

5.2.1. Podpora na bázi hydrogelů

Hydrogely je možné připravit více způsoby v závislosti na prováděném experimentu. Můžeme rozlišovat hydrogely na přírodní a syntetické. Hydrogely na přírodní bázi se vyrábí z přírodních polymerů, např. fibrinogen, kolagen, želatina, kyselina hyaluronová, chitosan, alginát či komplexní směsi přírodního původu. Syntetické hydrogely jsou

obvykle vyráběny za použití syntetických polymerů z polyethylenglykolu (PEG), polyvinlacetátu a kyseliny polymléčné. Jedinečnou vlastností hydrogelů je napodobování ECM vč. napodobování prostupnost pro rozpustné látky, jako mohou být růstové faktory či cytokiny. Volba typu hydrogelu zásadně ovlivňuje buněčné chování včetně proliferace, diferenciace [9], [14], [15].

5.2.2. Podpora na bázi tvrdých polymerních materiálů

Polymerní tvrdé formy jsou důležitým nástrojem při studiu interakce díky schopnosti opory kopírovat strukturu ECM. Studie ukázala rozdíl mezi kultivací 2D a 3D. Jaterní buňky ve 3D polymerním materiálu byly méně ovlivněny cytotoxickými sloučeninami a měly větší životaschopnost než buňky kultivované ve 2D uspořádání [9].

5.2.3. Vláknité formy podpory

Scaffold na bázi vláken je atraktivní pro tkáňové inženýrství kvůli strukturám, jako jsou vláknité proteiny vyskytující se v běžném ECM. V závislosti na použitém typu buněk lze manipulovat se scaffoldy na bázi vláken natolik, aby bylo vytvořeno odpovídající mikroprostředí. Tyto vláknité struktury lze vytvořit ve formě kompozitních/hybridních scaffoldů, mikrofluidní vláknité scaffoldy, nanovláknité struktury nebo elektrospunové vláknité scaffoldy. Ve studii z roku 2020 byl vyvíjen model na základě hedvábného fibroinu získaného z kokonu bource morušového. Tato studie použila rýžový papír, který byl potažen tímto hedvábným fibroinem. Následně byla prokázaná biokompatibilita kultivací lidských buněk karcinomu prsu, jater a plic, kde byla následně také úspěšně prokázána tvorba sféroidů [16].

5.3. Metody kultivace bez vnější opory

Metody kultivace bez vnější opory se spoléhají na schopnost buněk se samostatně organizovat. To napomáhá tvorbě 3D kultur podobných přirozené tkáňové architektuře, vytvářet vlastní ECM a mezibuněčné interakce. Tyto metody jsou flexibilnější z hlediska typů buněk, které lze tímto způsobem kultivovat, protože nejsou závislé na použití specifických proteinů ECM. Další výhodou metod bez vnější opory je lepší kontrola prostředí jako je hladina kyslíku a živin, které jsou zásadními faktory pro růst a přežití buněk. Jsou efektivnější a snadněji se rozšiřují pro použití v klinické praxi nebo rozsáhlejších experimentech [13][14], [17].

5.3.1. Metoda visuté kapky

Malá kapička buněčné suspenze se umístí do zvlhčené komory/mikrotitrační destičky s otevřeným dnem, v této kapce dochází k agregaci shluku buněk vzniklým působením gravitace ve spodní části kapky. Tímto způsobem mohou vznikat sféroidy v minimálním objemu média. Po vytvoření sféroidu je ovšem nutné je přenést např. na mikrotitrační destičku pro další kultivaci v médiu. Tato metoda má vysokou replikovatelnost, a tím i širokou škálu využití. Mezi nevýhody patří její časová náročnost, malá kapka suspenze značně omezuje počet kultivovaných buněk v jedné kapce, kapka ovlivňuje i tvar a velikost vznikajícího sféroidu. Tato metoda je nevhodná pro typy buněk vyžadující pro tvorbu sféroidu delší čas [9], [13].

5.3.2. Magnetická levitace

Tato metoda je založena na magnetických částicích, které jsou vpraveny do buněk, ty následně umožňují, aby se působením vnějšího magnetu shlukovaly v homogenní a uniformní agregáty. V takto vytvořeném buněčném prostředí je možno syntetizovat ECM. Mimo jiné externí magnet umožňuje manipulaci se vzniklou 3D kulturou. Další výhodou je, že magnetickou levitaci lze použít k vytvoření univerzálního a dynamického buněčného mikroprostředí např. k napodobení mechanického proudění krve. Nevýhodou mohou být vysoké náklady na magnetické částice a zařízení, dále může být problém je rozšířit na větší počty buněk nebo větší buněčné kultury, také záleží na typu magnetických částic, které nemusí být kompatibilní s danými typy buněk, nebo mohou být potřeba další kroky k odstranění těchto částic ze vzniklých agregátů [9], [13].

5.3.3. Nepřilnavé destičky a metoda nuceného vznášení

Základním bodem této metody je použití povrchu, který buňky spíše odpuzuje místo aby podporoval jejich uchycení, touto skutečností je nutí ke shlukování k sobě a následný růst ve sféroidy. Existuje několik druhů nepřilnavých destiček jako jsou destičky s velmi nízkou přilnavostí (ULA), které mohou být plastové či skleněné s upraveným povrchem tak, aby zabraňoval přichycení a šíření buněk, a destiček potažených hydrogely. Metoda ULA je snadná a jednoduchá, protože vyžaduje jen speciální typ destičky. Při porovnání ULA destičky a metody závěsné kapky byly obě metody sto vytvářet sféroidy s podobnými vlastnostmi, ovšem metoda ULA destiček se ukázala jako jednodušší a vhodnější pro generování sféroidů pro testy cytotoxicity a screening léčiv. Nevýhodou

ULA metody je riziko přilnutí určitého typu buněk ke stěnám a s tím spojená tvorba monovrstvy i přes skutečnost, že povrch je ošetřen tak, aby k tomuto jevu nedocházelo. Nedostatečná standardizace této metody vede k vysoké různorodosti jak tvaru, tak velikosti sféroidů [13][14].

5.3.4. Nucená agregace do mikrotěles

Tato metoda zahrnuje použití mikrojamek obvykle vytvořených v polymerním substrátu, do těch je vložena suspenze buněk a média, buňky sedimentují na dno těchto mikrojamek a následně agregují do 3D struktur. Předností této metody je tvorba ve velkém měřítku a kontrola tvaru a velikosti. V jedné jamce může vznikat více 3D kultur. Tento model byl použit pro dobře kontrolovanému a reprodukovatelnému vytváření sféroidů s různými typy nádorových buněk. Omezení této metody spočívá v přerůstání (tomu lze zabránit použitím mikrotitrační destiček s většími jamkami). Další nevýhodou je nemožnost udržení agregátů v příslušných jamkách kvůli jejich přilnutí, proto je třeba je přenést na novou ULA destičku [13].

	Funkce	Příprava	Výhody a aplikace
Podpora na bázi hydrogelů	Může být replikováno ECM Mohou být naplněny biologickými tekutinami a vodou Může probíhat osmoregulace	Chemické síťování, polymerace volnými radikály, síťování zářením a fyzikální síťování prostřednictvím polyelektrické komplexace, vodíkové vazby a hydrofobní asociace	Chytré hydrogely mohou reagovat na podněty z prostředí, jako jsou změny teploty, pH, iontová síla, záření, elektrické pole a další Intersticiální proudění a difúzní transport Slouží jako zásobárna léčiv, tkáňová bariéra a systém pro přenos bioaktivních látek, který stimuluje přirozený reparační proces
Podpora na bázi tvrdých polymerních materiálů	Tato podpora se používá k replikaci ECM, buňky se mohou připojit a vytvořit 3D kultury	Buňky dozrávají na konstrukci a slouží k modelování nádorů nebo tkání Kultury se pak rozřežou na rozměr, který se vejde do daného nosiče	Postupy ošetření buněk jsou velmi podobné jako u 2D buněčných kultur Velmi reprodukovatelné Tumoroidy vypěstované ze vzorků pacientů vykazují slibné známky pro screening a vývoj léčiv Regenerace tkání kostí, vazů, chrupavek, kosterního a cévního svalstva a tkání centrálního nervového systému
Hydrofilní skleněná vlákna	Modeluje ECM Lze použít v testech migrace, invaze, chemoinvaze a angiogeneze	Běžně se provádí pomocí laboratorního zařízení SeedEZTM od společnosti Lena Biosciences 3D buněčné kultury budou mít konzistentnější tvar, rozložení, tloušťku a rozložení buněk v rozměrech X/Y/Z	Lze provádět experimenty s bodovými kulturami, smíšenými buněčnými kulturami, experimenty s gelovou suspenzí v sol stavu, bezkontaktní a kontaktní metody kokultivace pomocí techniky trojrozměrných živných vrstev apod.. Buňky mohou být různého původu a zdrojů Dokáže *in vitro* kultivovat pokročilé 3D modely nádorů po dlouhou dobu
Magnetická levitace	Magnetické síly umožňují agregaci buněk a zároveň indukují syntézu ECM Podporuje mezibuněčnou interakci	Vytvořené tak, že se buňky naplní magnetickými nanočásticemi a poté se vystaví vnějšímu magnetickému poli, které způsobí tak, že se buňky shluknou do sféroidu	Nevyžaduje specifické médium Pracuje s běžnými technikami 2D kultur Pracuje s širokou škálou buněčných typů Neomezuje se pouze na 96 jamkové destičky Tvorba sféroidů trvá přibližně 16 hodin Dokáže vytvořit 3D kulturu bez použití umělého proteinového substrátu Může syntetizovat ECM při formování
ULA mikrotitrační destičky	Povrch s velmi nízkou přilnavostí snižuje přilnavost buněk a podporuje tak tvorbu sféroidů	Obvykle jsou vyrobeny z polystyrenu a opatřeny hydrofilními nebo hydrofobními povrchy, nebo jsou vyrobeny z přírodních polymerů, jako je agaróza Jamky se dnem ve tvaru písmene U podporují konzistentní tvorbu sféroidů ve všech jamkách	Přenos sféroidů na novou destičku je často zbytečný kvůli velkému objemu 96 nebo 384 jamkových destiček Sféroidy lidských buněk karcinomu prsu napodobovaly vlastnosti in vivo, jako je hypoxie, dormance, anti-apoptotické vlastnosti a rezistence vůči lékům v jedné studii 3D neurokuličky se ukázaly jako užitečné při studiu kinetiky růstu a toxicity léčiv

Tabulka 1 Porovnání vybraných metod pro 3D kultivaci [9].

5.4. Limity, omezení a nevýhody 3D kultivace

3D kultivace oproti 2D vyžaduje více znalostí. Komplikace nastávají u výměny kultivačního média, udržování integrity extracelulárního matrix, případná kontaminace kultur navzájem během experimentů.

3D kultury sebou přináší omezení v přístupu živin, kvůli chybějící vaskularizaci, zastoupení jednotlivých buněčných typů, dostupnost původních tkání a jejich architektura, komunikace s dalšími orgány a imunitními buňkami, které běžně do tkání pronikají.

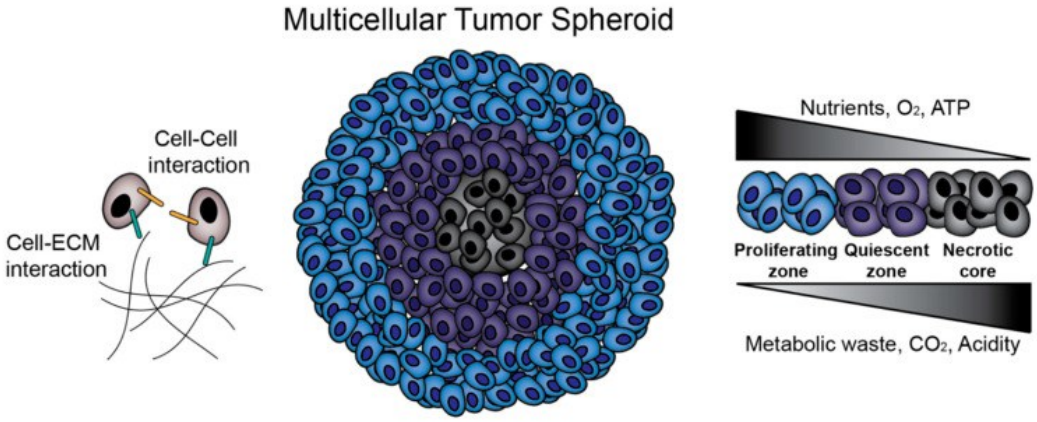
Navzdory vývoji nových standardizovaných technik je důležitá i cena nákladů, která je stále vyšší u 3D kultivací než u 2D kultivace. Pokud by se v budoucnu podařilo tyto náklady snížit, mohlo by to znamenat další omezení používání zvířecích modelů.

Dalším důležitým tématem je standardizace, a to nejen kultivačních technik a technologií ale i analýzy 3D buněčných kultur, právě 3D rozměr způsobuje rozdíl v průniku a difúzi činidel. Měření buněčné aktivity v 3D modelech může probíhat pomocí technik jako jsou konfokální mikroskopie nebo prosvětlení tkání, standardizace těchto technik je však obtížná [12], [18].

5.5. Mnohobuněčné nádorové sféroidy (MCTS)

Tento model je typem 3D kultury, a jako takový je mezistupněm mezi 2D buněčnou kulturou a modelem národu *in vivo*. MCTS jsou kultivovány ze suspenze nádorových buněk, strukturou připomíná avaskularizovaný mikrotumor podobný metastázám nacházejících se v tělech pacientů. MCTS mají některé základní skutečnosti společné s *in vivo* nádory. Růst MCTS je podobný růstu, který můžeme pozorovat u solidních nádorů, které též rostou od středu směrem k periferii. V ideálně tvarovaném MCTS je vzdálenost od každého povrchového bodu ke středu stejná, tato symetrie poskytuje model pro fyziologický gradient kyslíku, živin, rozpustných signálních molekul a metabolitů. V důsledku těchto gradientů vznikají uvnitř různé zóny, pro které je charakteristické různé chování buněk. V jádru se nachází nekrotická zóna, kde v důsledku hypoxie, nedostatku živin a růstových faktorů a přebytku odpadních látek dochází k odumírání většiny buněk. Směrem k povrchu se nachází zóna „klidných“ ale životaschopných buněk a ve vnější zóně, kde jsou buňky vystaveny dostatečnému množství kyslíku i živin, dochází k rychlé proliferaci a růstu. Šíře životaschopné vrstvy klesá s klesajícím dvojnásobkem času. Rychle rostoucí sféroidy tíhnou k větší spotřebě kyslíku a poklesu pH. Tyto vlastnosti jsou žádoucí obzvláště při hodnocení léčby závislé na kyslíku, jakou je PDT nebo třeba ionizující záření. Dalším klíčovým bodem pro MCTS je ECM. Velká část

proteinů běžně se vyskytující v ECM nádoru *in vivo*, kterými mohou být fibronektin, kolagen nebo třeba laminin, lze nalézt v podobném poměru i v MCTS [19], [20], [21].



Obrázek 4, Mnohobuněčný nádorový sféroid (MCTS). MCTS má tři vrstvy, na obrázku znázorněné různými barvami, uprostřed se nachází nekrotické jádro (šedá), prostřední vrstvou je klidová zóna (fialová) a na vnější části sféroidu se nachází proliferační vrstva (modrá). Vpravo jsou naznačeny měnící se gradienty. Vrchní znázorňuje rozložení živin, kyslíku a ATP (směrem do středu sféroidu koncentrace těchto prvků klesá). Naopak je tomu u metabolického odpadu, oxidu uhličitého a kyselosti, která jsou největší právě v nekrotickém jádře. V levé části obrázku jsou jednoduše znázorněny interakce mezi buňkami a interakce mezi buňkami a ECM [22].

5.5.1. Kultivace a vliv buněčné linie

Po několika dnech od nasazení buněk vznikají MCTS, nejprve se formují agregáty kulatého až oválného tvaru, které s probíhající kultivací postupně získávají tvar sféroidu. Kultivační metoda, kultivační médium, typ a hustota buněk či mechanické namáhání, to všechno jsou faktory, které ovlivňují morfologii MCTS. Podle kompaktnosti můžeme vzniklé MCTS rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou kompaktní sféroidy, kde jsou buňky pevně vázány jedna na druhou takovým způsobem, že může být až obtížné rozlišit jednotlivé buňky, druhou skupinou jsou těsné agregáty a poslední třetí skupinou jsou volné agregáty – pro tyto dvě skupiny je shodným znakem, že nemohou vytvořit dokonalý sféroid, a snadno u nich dochází k rozpadu. Počáteční agregaci iniciuje navázání na molekuly ECM zprostředkovaným integrinem, kompaktně agregovány jsou buňky po iniciaci E cadherinem [19], [23].

Tvorba MCTS závisí též na výběru vhodné linie buněk. Některé nádorové buňky vykazovaly vysokou účinnost při tvorbě sféroidů, jiné nízkou či žádnou. Buňky nádoru stejného typu se v účinnost tvorby MCTS lišily v závislosti na konkrétní buněčné linii. Například v případě buněk karcinomu žaludku tvoří kompaktní sféroidy např. buněčné linie RF-1,

RF-48 a Hs-746. Těsné agregáty tvoří např. linie MKN-28, MKN-74 a N87. Volné agregáty byly kultivovány např. z linií SNU-5 a SNU-6. Obdobně tomu bylo i u linií buněk karcinomu prsu kde byly kompaktní sféroidy tvořeny liniemi MCF-7, BT-474, T47D a MDA-MB-361. Linie MDA-MB-435S agregovaly do těsných agregátů a volné agregáty tvořily linie MDA-MB-231. Za rozdíly ve tvorbě a kompaktnosti sféroidů jsou zodpovědné vrozené rozdíly v adhezi. Buněčné linie vylučující vysokou hladinu E-cadherinu vytvářely kompaktní sféroidy, zrychlenou expresi N-cadherinu vykazovaly linie tvořící těsné agregáty. Pokud ztratí buňky adhezní molekuly, ztratí tím také schopnost tvořit sféroidy [19], [23].

6. 3D heterotypické modely

6.1. Sféroidy a organoidy

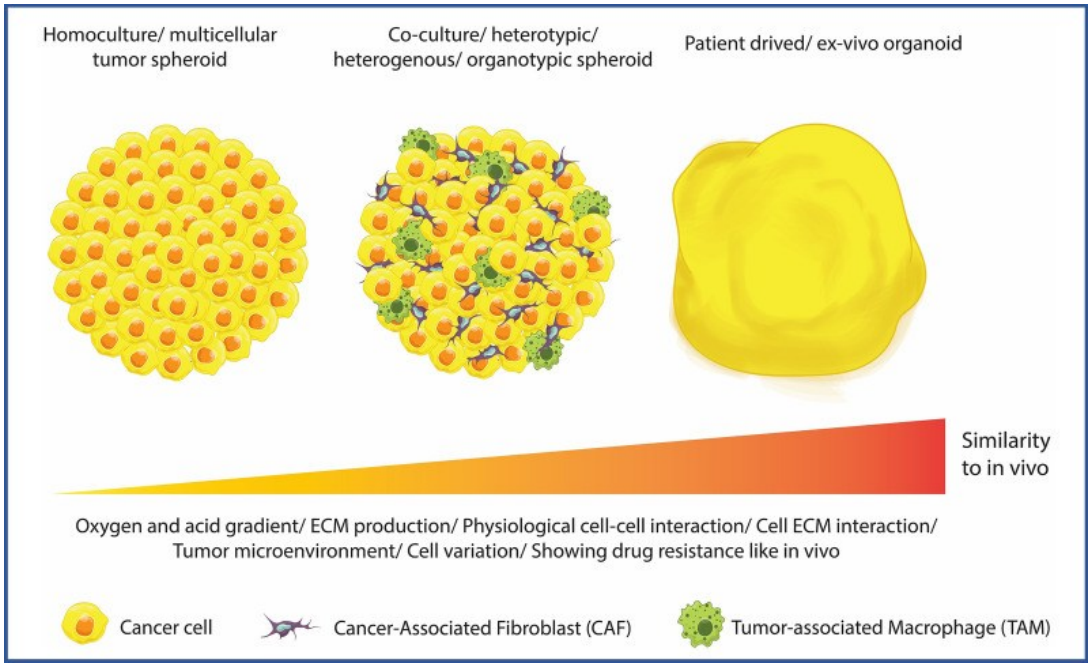
Sféroidy i organoidy jsou 3D buněčné struktury vytvořené agregací mnoha buněk, termíny sféroid a organoid se často používaly zaměnitelně, ovšem je mezi nimi rozdíl [11].

Sféroidy jsou 3D buněčné agregáty vytvořené kultivací *in vitro*. Mohou replikovat buněčné interakce, růstovou kinetiku či *de novo* ukládání ECM solidních lidských nádorů. Prokazuje se, že silné kontakty mezi buňkami nádorových sféroidů a husté ECM nesou zodpovědnost za chemorezistenci, protože představují fyzickou bariéru pro imunitní buňky a chemoterapeutika. Pokud jsou kultivované nádorové sféroidy velikostně větší než 400 µm, mají schopnost vytvářet gradient kyslíku a živin podobný gradientům *in vivo*, kde je přítomno nekrotické jádro, „klidová“ zóna a proliferující vnější vrstva. Tyto oblasti vznikají v důsledku omezeného transportu molekul. Tato skutečnost vytváří možnost studia vlivu hypoxie na tvorbu nádorů, angiogenezi a také na účinnost léčiv [11], [17].

Zatímco sféroid je pouze 3D buněčným agregátem, organoid má schopnost sebediferenciace. To znamená strukturou a funkcí je do určité míry podobný orgánu člověka. Organoidy i sféroidy se liší původem buněk a způsobem tvorby. Sféroidy jsou kultivovány jako volně plovoucí agregáty a mohou být kultivovány bez ECM, proto vykazují relativně nízkou strukturní složitost. Sféroidy jsou jednoduchými shluky buněk, jakými

mohou být buňky nádorové, hepatocyty, buňky mléčných žláz, nervové tkáně a embryonálního tělíska [11].

Organoidy jsou složité agregáty buněk specifických pro určitý orgán. Organoidy můžeme kultivovat z indukovaných pluripotentních kmenových buněk, dospělých kmenových buněk a embryonálních kmenových buněk. Organoidy jsou strukturně komplexní a rekapitulují vývoj orgánu *in vitro*, vykazují vlastnosti vícestupňové organogeneze, samy se sestavují a proliferují v prostředí jaké nabízí směs proteinů ECM nebo kolagen. Jsou velmi užitečné při studiu dědičnosti, organogeneze a patologie, zejména u orgánu s malou nebo žádnou regenerační schopností. Termín tumoroid nebo nádorový organoid nemusí být vždy ideální, protože nádorová tkáň není orgán s původním výskytem v lidském těle. Nádorový organoid je termín používaný v souvislosti s organoidem, který má původ v nádorových kmenových buňkách. Nádorové kmenové buňky mají nekonečnou schopnost reprodukovat nádorové progenitorové buňky a produkovat další nádorové buňky. Nádorové organoidy mají vlastnost sebeobnovy, jejich diferenciační schopnosti umožňují napodobení vlastností nádorových tkání, jakou může být např. intratumorální heterogenita [11], [17].



Obrázek 5 Porovnání homogenního sféroidu, heterogenního sféroidu a organoidu. Heterotypický sféroid je 3D buněčný útvar skládající se z více typu buněk (na obrázku z nádorových buněk, CAF a TAM) [24].

6.2. Nádorové mikroprostředí

Nádorové mikroprostředí (TME) je systém zahrnující buněčné složky, kam můžeme zařadit nádorově asociované fibroblasty, imunitní buňky, vaskulární endoteliální buňky, a nebuněčné složky, jako je ECM, tlak intersticiální tekutiny či hypoxie, všechny tyto složky ovlivňují nejen nádorovou progresi, metastázování a celý proces nádorového bujení, ale také účinnost léčby. Rezistence na léčiva zprostředkovaná TME je v důsledku neustálých interakcí mezi nádorovými buňkami a jejich okolím. Tvorba 3D *in vitro* modelů je klíčová pro zachycení komplexního TME s dynamickými interakcemi mezi nádory a jejich okolním stromatem [14], [24], [25], [26].

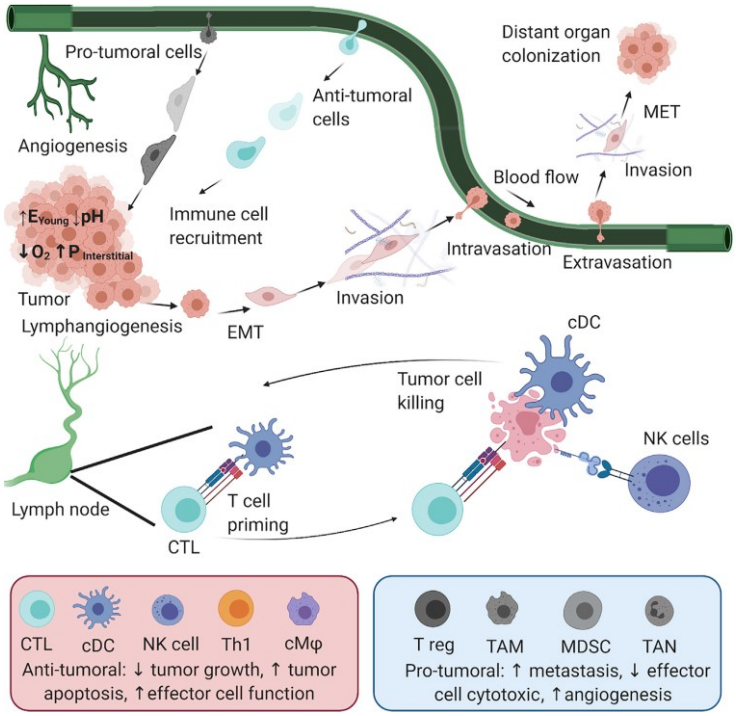
6.2.1. Nádorově asociované fibroblasty

Nádorově asociované fibroblasty (CAF) jsou velké vřetenovité stromální buňky, které vylučují hladkosvalový α-aktin, fenotypový marker aktivovaných fibroblastů, jsou také nejvíce se vyskytujícím typem buněk v TME. Původ CAF je velmi různorodý. Největší část CAF pochází z lokálních fibroblastů působením cytokinů a růstových faktorů vylučovaných nádorovými buňkami, jinak mohou mít původ např. v mezenchymálních kmenových buňkách odvozených z kostní dřeně nebo v endoteliálních buňkách procházejících epiteliálně-mezenchymálním přechodem. Aktivované CAF produkují parakrinně působící molekuly, jakými jsou vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), růstový faktor odvozený od destiček (PDGF), transformující růstový faktor β1 (TGF-β1), faktor odvozený ze stromálních buněk-1 (SDF-1), hepatocytární růstový faktor (HGF) a epidermální růstový faktor (EGF). Tyto molekuly podporují růst nádorů, angiogenezi a rezistenci vůči chemoterapii. CAF mohou vylučovat složky ECM a uvolňovat proteolytické enzymy modelující ECM, to může formovat TME takovým způsobem, aby se stalo příznivější pro invazi a růst nádoru. Vysoký počet CAF nacházejících se ve stromatu koreluje se špatnými klinickými výsledky u pacientů s karcinomem slinivky břišní, prsu a plic [14], [27].

6.2.2. Imunitní buňky

Imunitní buňky v TME lez rozdělit na dvě hlavní skupiny, tumor podporující a tumor potlačující. Mezi nádor podporující mohou být zařazeny myeloidní supresorové buňky, regulační T-lymfocyty a imunosupresivní makrofágy asociované s nádorem. Do skupiny nádor potlačujících buněk můžeme zařadit NK buňky, konvenční dendritické buňky,

cytotoxické T-lymfocyty a pomocné lymfocyty Th1. Imunitní buňky obou těchto skupin mohou ovlivňovat chování nádoru a účinnost terapie jak přímým kontaktem, tak parakrinní signalizací [14], [25].



Obrázek 4 Nádorové mikroprostředí. Pronádorové (modrý rámeček) a protinádorové (červený rámeček) imunitní buňky. CTL – cytotoxické T-lymfocyty, cDC – konvenční dendritické buňky, NK cell – NK buňky, Th1 – pomocné T-lymfocyty, cMF – cytotoxické makrofágy, T reg – regulační T-lymfocyty, TAM – makrofágy asociované s nádory, MDCS – myeloidní supresorové buňky, TAN – neutrofily asociované s nádory, EMT – epiteliálně-mezenchymální přechod, MET – metastáze [25].

6.2.3. Vaskulární endoteliální buňky

Jedním z důležitých bodů pro napodobení TME *in vitro* je zohlednění cévní sítě. Charakteristický znak nádorů je tvorba nových cév z původní cévní sítě pro lepší přísun kyslíku a živin – angiogeneze. Nádorové buňky spolu se stromálními buňkami vylučují v TME různé růstové faktory jako jsou VEGF, fibroblastový růstový faktor (FGF) nebo třeba PDGF. V porovnání s normální cévní soustavou má nádorová cévní soustava abnormální morfologické i funkční vlastnosti – neuspořádanost cévní sítě, netěsnost, či heterogenní průtok krve. Tyto odchylky vedou ke zvýšenému tlaku intersticiální tekutiny a oblastem hypoxie, tato cévní síť též omezuje přístup jak imunitních buněk, tak protinádorových léčiv k nádorům, to vede k horším výsledkům léčby nádorových onemocnění [14], [26], [27].

6.2.4. Extracelulární matrix (ECM)

ECM je trojrozměrná proteinová síť obsahující kolagen, laminin, fibronektin a glykosaminy, které mohou tvořit až 60 % TME. ECM se v závislosti na stádiu a typu národu liší mikroarchitekturou a složením ECM. ECM v nádorových tkáních funguje jako podpůrné lešení a jako zásobárna růstových faktorů důležitých pro invazi, růst a metastázování nádoru. Během vývoje nádoru stromální buňky asociované s nádorem a nádorové buňky stále mění organizaci a složení ECM pomocí cyklů ukládání či degradace a rozsáhlého zesíťování, tím ho utváří tak, aby co nejvíce podporovala růst nádoru. Zvýšené ukládání a síťování ECM vede k tužšímu stromatu oproti normálním tkáním, tato skutečnost podporuje invazivitu a angiogenezi nádoru. Tato přetvořená ECM zároveň s buněčným křížením a stavbou ECM představuje fyzickou bariéru pro průnik léčiv, imunitních buněk a protilátek do místa nádoru. Bylo zjištěno, že nádory se zarovnanými kolagenovými sítěmi mají nižší průnik léčiv, proto je velmi důležité napodobovat *in vitro* u 3D modelů biochemické a biofyzikální vlastnosti ECM [14], [27].

6.3. Buněčné interakce mezi nádorovými buňkami a dalšími typy buněk

TME je typické svou různorodostí v oblasti nebuněčných i buněčných složek. Samotné nádorové buňky proto nemohou dostatečně vysvětlit iniciaci, progresi, metastázováni či rezistenci na léky. Neustálá interakce stromálních nenádorových buněk, jakými jsou například CAF, endoteliální buňky nebo imunitní buňky, s buňkami nádorovými, je v TME běžným jevem. Vytvoření ko-kultur, které by právě tyto buněčné složky obsahovalo, by zlepšilo přesnost 3D buněčných modelů, protože přítomnost dalších než jen nádorových buněk může ovlivňovat reakci na léčbu v důsledku vzájemných mezibuněčných interakcí [24].

Důležitým prvkem v progresi nádorů jsou CAF, které se primárně podílejí na ukládání a odbourávání ECM v nádorové tkáni, tato skutečnost významně ovlivňuje jak rezistenci, tak invazi nádorů. Bylo prokázáno, že sféroidy s obsahem fibroblastů indukovaly produkci složek ECM jakými jsou například fibronektin, kolagen nebo třeba glykosaminoglykany, tyto složky ECM nejsou snadno detekovatelné v ECM homotypických sféroidů. Přítomnost CAF ve sféroidech může přispět k přesnějšímu hodnocení průniku, toxicity, invaze a migrace léčiv do nádorů [24], [28], [29].

Endotelové buňky jsou důležité v rámci angiogeneze a invazivity nádorů. Tato skutečnost z nich dělá cíl protinádorové léčby, k tomu značné napomáhá, že byly vytvořeny heterotypické sféroidy, které věrně napodobovaly fyziologické okolnosti, jako je například netěsnící endotelová vrstva kolem jádra nádorových buněk. Nádorové buňky vylučováním proangiogeních růstových faktorů, jakým je například VEGF, podporují vývoj nepravidelných cév zásobující nádor kyslíkem a živinami. Endotelové buňky přispívají k neuspořádanému TME a to napomáhá progresi nádoru a jeho chemorezistenci [24], [29].

3D heterotypické modely, jejichž součástí jsou imunitní buňky, jakými jsou například makrofágy, se stávají stále atraktivnějšími při posuzování vlivu infiltrace imunitních buněk na růst nádoru a zkoumání účinnosti nových terapeutik. Hlavní roli v TME hrají makrofágy. Regulují iniciaci, progresi i metastázování nádorů. TAM odvozené od tkáňových makrofágů nebo cirkulujících monocytů, které pronikají do nádorové tkáně a v reakci na TME se diferencují na makrofágy M2, přímo ovlivňují remodelaci ECM, angiogenezi a invazi nádoru. Vzájemná komplexní komunikace mezi TAM a nebuněčnými složkami TME podporuje migraci nádorových buněk. Vysoká infiltrace TAM ve stromatu nádoru je spjatá se špatnou prognózou onemocnění [24], [28].

7. 3D kultury a PDT

7.1. Homotypické kultury a PDT

Homotypické kultury (tvořené jedním typem buněk neboli monokultury) v souvislosti s PDT bývají využity k porovnání účinnosti PDT na monovrstvách a MCTS, kultivovaných ze stejné buněčné linie. Tyto modely se stávají čím dál častější ve studiu účinnosti nových terapeutických látek (nejen PDT) pro svou jednoduchost a snadnou přípravu s možností automatizace s využitím ULA destiček podobně, jako tomu je u klasických 2D modelů (monovrstvy buněk v mikrotitračních destičkách).

Ze studií, které se zabývaly touto tématikou vyplývá, že se působení PDT na tyto dva buněčné modely může lišit. Průnik PS do sféroidů a jeho převažující akumulace ve vnějších vrstvách je klíčovým faktorem ovlivňujícím rozdílnou odpověď na PDT mezi povrchovou vrstvou a centrem sféroidu. Povrchová vrstva má podobnou účinnost vůči PDT jako monovrstva, v hlubších vrstvách sféroidu jsou buňky méně ovlivněny, zůstávají životaschopné a udržují či podporují růst 3D kultury i při intenzivní terapii. Tato nehomogenní akumulace PS více odpovídá situaci u nádorů *in vivo,* proto jdou sféroidy vhodnějším modelem pro zkoumání účinnosti PDT než monovrstva. Tato zjištění podtrhují důležitost volby správného buněčného modelu[30], [31], [32].

Homotypické sféroidy jsou též vhodným nástrojem pro výzkum inovací týkajících se PS. Může se jednat o zapouzdření již klinicky schváleného PS, jakým je verteporfin, do lipidových nanonosičů za účelem dosáhnou cílené PDT, použití liposomů pro dodání lipofilního PS do cílových buněk či potažení nanočástice membránami odvozenými od mezenchymálních kmenových buněk a tím jim propůjčí biomimetické vlastnosti, které ovlivní nižší vychytávání makrofágy. Nanočástice spojené s PS mohou být též obohaceny o specifické protilátky nebo mohou být zaměřeny na specifickou epitelovou adhezní molekulu a tím zvýšit svoji specifičnost vůči vybraným nádorovým buňkám [33], [34], [35], [36], [37].

Důležitým námětem pro klinické studie je též prostředí, v jakém se kultivované buňky nachází, vliv hormonů ovlivňuje účinek PDT. Konkrétně např. účinek PDT na sféroidy adenokarcinomu prsu produkované z buněčné linie MCF-7 byl vyšší v prostředí

modulovaném hormony estrogenem, progesteronem a kombinací estrogenu a progesteronu [38].

7.2. Heterotypické kultury a PDT

Použití heterotypických buněčných modelů umožňuje zaměřit se v preklinických studiích na komplexnější problematiku, než je působení na konkrétní buněčnou linii.

Kombinace více buněčných linií dává prostor ke stanovení optimálních podmínek PDT tak, aby byl prokázán účinek zvoleného PS vůči nádorovým buňkám, nicméně normální buňky zůstaly bez poškození. Heterotypické sféroidy jsou též vhodným modelem pro účinky PDT zaměřené na vaskulární síť. Pokud jsou do studie zahrnuty modely na více úrovních složitosti, mohou být účinky PDT objasněny na každém z nich a tím nabídnou komplexní informace působení PDT ve vztahu k vaskularizaci každého z nich [39], [40].

Důležitou součásti ko-kultur je jejich mikroprostředí. Pokud je model kultivován pouze z jednoho typu buněk, jako je tomu u homotypických kultur, není tento model schopný napodobit dostatečně komplexní TME.

Jednou z problematik související s komplexním TME je radiací indukovaná fibróza, která je pozdní radiační toxicitou u karcinomu prsu. Pro studium zohledňující buněčné interakce byl vytvořen sféroidní model z buněčných linií MCF-7 (buněčná linie karcinomu prsu) a MRC-5 (buněčná linie fibroblastů). Při společné kultivaci s nádorovými buňkami byla potvrzena přeměna zdravých fibroblastů na myofibroblasty [41].

Sféroidy odvozené od glioblastomu, které byly použity pro objasnění mechanismů chováni perivaskulární oblasti, byly ko-kultivovány s endoteliálními buňkami. Tento heterotypický model prokázal skutečnost, že endoteliální buňky zvyšují schopnost invaze a růst nádorových buněk obohacených o interleukin-8 (IL-8). Vliv IL-8 byl následně potvrzen *in vitro* na monokulturách glioblastomových buněk a *in vivo* na myších modelech[42].

Kultivace ko-kultur je též vhodná pro objasnění prostorové distribuce jednotlivých typů buněk a vývoje složení sféroidu. Ve studii zabývající se touto problematikou byly použity tři typy buněk PANC-1 (buněčná linie karcinomu pankreatu), MRC-5 (buněčná linie fibroblastů) a HUVEC (endoteliální buněčná linie) kultivované společné ve formě sféroidů. Výstupem byla charakterizace rozložení buněk ve sféroidech: jádro bohaté na

fibroblasty a fibronektin a v něm homogenně rozmístěny endotelové buňky a nádorové buňky pankreatu na periferii. Všechny zjištěné informace o TME zmíněné v tomto odstavci mohou být klíčové pro terapeutické účely [43].

Jak bylo shrnuto v předchozích třech odstavcích, sice se objevují studie zaměřující se na problematiku heterotypických kultur ve vztahu k nádorům, ve vztahu k PDT jde zatím o nepříliš probádanou oblast a počet takto zaměřeních studií je velmi omezený.

Jedna taková studie se například zabývala heterotypickou kulturou, v tomto případě nazývanou tumoroid, která sloužila jako model pro stanovení vlivu kombinované terapie skládající se ze sekvenční PDT za použití protoporfyrinu IX a viru vezikulární stomatitidy (VSV). Pro kultivaci byly zvoleny buněčné linie T98G a LN229. Obě části byly testovány na sféroidech kultivovaných ze zmíněných buněčných linií, kde byly prokázány cytotoxické účinky, které byly v menší míře prokázány i u tumoroidů. Tato skutečnost poukazuje na rozdíly mezi homotypickými a heterotypickými buněčnými modely. Kombinovaná terapie s užitím konjugátu VSV a protoporfyrinu IX, která vedla k úplné buněčné smrti, také umožnila nižší titr viru a nižší koncentraci použitého PS k dosažení významného cytotoxického účinku. Zavedení kombinované terapie by mohlo být cestou k menšímu počtu vedlejších účinků[44].

8. Závěr

PDT je neinvazivní či minimálně invazivní léčebnou metodou, která se stále vyvíjí. Jejími základními prvky jsou světelný zdroj, PS a kyslík. Hlavní otázkou v dalším vývoji této terapie jsou PS, u kterých je nutné překonat jejich lipofilní povahu a tím zlepšit jejich rozpustnost ve vodě. Proto se objevují buď nové PS se strukturními obměnami dovolujícími lepší rozpustnost ve vodném prostředí, nebo inovativní způsoby kombinace PS s nosičovými systémy, jako jsou nanočástice nebo třeba proteiny cílící na konkrétní molekuly v nádorové tkáni. Cílenější aplikace PS může být důležitým krokem pro snížení toxicity vůči nenádorovým tkáním, a tedy vyšší selektivita PDT.

Pro studium nových taktik použití PDT je nutno mít vhodný buněčný *in vitro* model. Rozšířené klasické 2D buněčné modely (monovrstvy) jsou jednoduché na kultivaci a levné, ovšem jejich buněčná odpověď na léčbu je zkreslená právě jejich jednoduchými vlastnostmi, kdy jsou všechny buňky vystaveny působení aplikovaných látek rovnoměrně, což neodpovídá situaci *in vivo*. Proto je třeba studium na 3D modelech, které lépe simulují situaci v živém organismu, a částečně tak nahrazují *in vivo* zvířecí modely.

MCTS jsou mnohobuněčným modelem, který připomíná mikrotumor bez vaskularizace. Skládá se pouze z jednoho typu buněk a volba buněčné linie zásadně ovlivňuje, jak úspěšně se bude daný MCTS formovat. Heterotypické sféroidy jsou dalším krokem v kultivaci směrem k bližšímu napodobení *in vivo*, jejich kultivace z různých buněčných typů simuluje vzájemné interakce buněk mezi sebou, ale i s nebuněčnými složkami tohoto systému.

3D buněčné modely lze shrnout jako mezikrok mezi klasickými *in vitro* modely a modely *in vivo*. Jejich použitím by se mohly snížit počty použitých zvířat ve vývoji nových léčiv. U kultivačních metod pro 3D metody je ovšem třeba ještě dalšího vývoje a standardizací, než se stanou běžnou složkou preklinického výzkumu jako je tomu u 2D buněčných modelů.

9. Literatura

[1] T. J. Dougherty *et al.*, “Photodynamic Therapy,” Oct. 2015.

[2] D. Aebisher, J. Szpara, and D. Bartusik-Aebisher, “Advances in Medicine: Photodynamic Therapy,” Aug. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms25158258.

[3] M. Przygoda, D. Bartusik-Aebisher, K. Dynarowicz, G. Cieślar, A. Kawczyk-Krupka, and D. Aebisher, “Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy,” Dec. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms242316890.

[4] D. Ramsay, H. Stevenson, and W. Jerjes, “Review from basic mechanisms to clinical research: Photodynamic therapy applications in head and neck malignancies and vascular anomalies,” Oct. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/jcm10194404.

[5] E. Lima and L. V. Reis, “Photodynamic Therapy: From the Basics to the Current Progress of N-Heterocyclic-Bearing Dyes as Effective Photosensitizers,” Jul. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/molecules28135092.

[6] W. Mytych, D. Bartusik-Aebisher, A. Łoś, K. Dynarowicz, A. Myśliwiec, and D. Aebisher, “Photodynamic Therapy for Atherosclerosis,” Feb. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms25041958.

[7] G. M. F. Calixto, J. Bernegossi, L. M. De Freitas, C. R. Fontana, M. Chorilli, and A. M. Grumezescu, “Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review,” Mar. 01, 2016, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules21030342.

[8] E. Suarez-Martinez, I. Suazo-Sanchez, M. Celis-Romero, and A. Carnero, “3D and organoid culture in research: physiology, hereditary genetic diseases and cancer,” Dec. 01, 2022, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s13578-022-00775-w.

[9] C. Jensen and Y. Teng, “Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?,” Mar. 06, 2020, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.

[10] Z. Peng, X. Lv, H. Sun, L. Zhao, and S. Huang, “3D tumor cultures for drug resistance and screening development in clinical applications,” Dec. 01, 2025, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s12943-025-02281-2.

[11] S. Y. Lee, I. S. Koo, H. J. Hwang, and D. W. Lee, “In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models,” Jun. 01, 2023, *Society for Laboratory Automation and Screening (SLAS)*. doi: 10.1016/j.slasd.2023.03.006.

[12] C. H. Park, J. H. Park, and Y. J. Suh, “Perspective of 3D culture in medicine: transforming disease research and therapeutic applications,” 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fbioe.2024.1491669.

[13] S. El Harane, B. Zidi, N. El Harane, K. H. Krause, T. Matthes, and O. Preynat-Seauve, “Cancer Spheroids and Organoids as Novel Tools for Research and Therapy: State of the Art and Challenges to Guide Precision Medicine,” Apr. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/cells12071001.

[14] W. Li *et al.*, “3D Biomimetic Models to Reconstitute Tumor Microenvironment In Vitro: Spheroids, Organoids, and Tumor-on-a-Chip,” Jul. 17, 2023, *John Wiley and Sons Inc*. doi: 10.1002/adhm.202202609.

[15] Y. Zhang *et al.*, “Hydrogel-Based Strategies for Liver Tissue Engineering,” Dec. 26, 2024, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/cbe.4c00079.

[16] K. H. Lee and T. H. Kim, “Recent advances in multicellular tumor spheroid generation for drug screening,” Nov. 01, 2021, *MDPI*. doi: 10.3390/bios11110445.

[17] N. Manduca, E. Maccafeo, R. De Maria, A. Sistigu, and M. Musella, “3D cancer models: One step closer to in vitro human studies,” 2023, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fimmu.2023.1175503.

[18] A. Caddeo, S. Maurotti, L. Kovooru, and S. Romeo, “3D culture models to study pathophysiology of steatotic liver disease,” Jun. 01, 2024, *Elsevier Ireland Ltd*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2024.117544.

[19] S. J. Han, S. Kwon, and K. S. Kim, “Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase,” Dec. 01, 2021, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s12935-021-01853-8.

[20] M. Millard, I. Yakavets, V. Zorin, A. Kulmukhamedova, S. Marchal, and L. Bezdetnaya, “Drug delivery to solid tumors: The predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening,” Oct. 31, 2017, *Dove Medical Press Ltd.* doi: 10.2147/IJN.S146927.

[21] A. G. Mitrakas *et al.*, “Applications and Advances of Multicellular Tumor Spheroids: Challenges in Their Development and Analysis,” Apr. 01, 2023, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms24086949.

[22] A. Kamatar, G. Gunay, and H. Acar, “Natural and synthetic biomaterials for engineering multicellular tumor spheroids,” Nov. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/polym12112506.

[23] S. J. Kochanek, D. A. Close, and P. A. Johnston, “High content screening characterization of head and neck squamous cell carcinoma multicellular tumor spheroid cultures generated in 384-well ultra-low attachment plates to screen for better cancer drug leads,” *Assay Drug Dev Technol*, vol. 17, no. 1, pp. 17–36, Jan. 2019, doi: 10.1089/adt.2018.896.

[24] F. Vakhshiteh *et al.*, “Heterotypic tumor spheroids: a platform for nanomedicine evaluation,” Dec. 01, 2023, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s12951-023-02021-y.

[25] S. E. Shelton, H. T. Nguyen, D. A. Barbie, and R. D. Kamm, “iScience Engineering approaches for studying immune-tumor cell interactions and immunotherapy,” *iScience*, vol. 24, p. 101985, 2021, doi: 10.1016/j.isci.

[26] E. Colombo and M. G. Cattaneo, “Multicellular 3d models to study tumour-stroma interactions,” Feb. 02, 2021, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms22041633.

[27] N. Vella, A. G. Fenech, and V. Petroni Magri, “3D cell culture models in research: applications to lung cancer pharmacology,” 2024, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fphar.2024.1438067.

[28] A. del M. B. Garnique and G. M. Machado-Santelli, “Characterization of 3D NSCLC Cell Cultures with Fibroblasts or Macrophages for Tumor Microenvironment Studies and Chemotherapy Screening,” *Cells*, vol. 12, no. 24, Dec. 2023, doi: 10.3390/cells12242790.

[29] J. N. N. Yau and G. Adriani, “Three-dimensional heterotypic colorectal cancer spheroid models for evaluation of drug response,” 2023, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fonc.2023.1148930.

[30] E. A. Sokolova *et al.*, “Model of ovarian adenocarcinoma spheroids for assessing photodynamic cytotoxicity,” *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 34–40, 2020, doi: 10.17691/stm2020.12.1.04.

[31] N. W. N. Simelane and H. Abrahamse, “Zinc phthalocyanine loaded- antibody functionalized nanoparticles enhance photodynamic therapy in monolayer (2-D) and multicellular tumour spheroid (3-D) cell cultures,” *Front Mol Biosci*, vol. 10, 2023, doi: 10.3389/fmolb.2023.1340212.

[32] A. Zuchowska, E. Jastrzebska, M. Chudy, A. Dybko, and Z. Brzozka, “Advanced 3D Spheroid Culture for Evaluation of Photodynamic Therapy in Microfluidic System,” in *Procedia Engineering*, Elsevier Ltd, 2016, pp. 403–406. doi: 10.1016/j.proeng.2016.11.184.

[33] T. Michy *et al.*, “Verteporfin-loaded lipid nanoparticles improve ovarian cancer photodynamic therapy in vitro and in vivo,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.3390/cancers11111760.

[34] K. Moloudi, H. Abrahamse, and B. P. George, “Application of liposomal nanoparticles of berberine in photodynamic therapy of A549 lung cancer spheroids,” *Biochem Biophys Rep*, vol. 40, Dec. 2024, doi: 10.1016/j.bbrep.2024.101877.

[35] G. Avancini, L. Menilli, A. Visentin, C. Milani, F. Mastrotto, and F. Moret, “Mesenchymal Stem Cell Membrane-Coated TPCS 2a-Loaded Nanoparticles for Breast Cancer Photodynamic Therapy,” 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics.

[36] N. W. N. Simelane and H. Abrahamse, “Actively targeted photodynamic therapy in multicellular colorectal cancer spheroids via functionalised gold nanoparticles,” *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 52, no. 1, pp. 309–320, 2024, doi: 10.1080/21691401.2024.2357693.

[37] D. van den Brand *et al.*, “Epcam-binding darpins for targeted photodynamic therapy of ovarian cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 7, pp. 1–22, Jul. 2020, doi: 10.3390/cancers12071762.

[38] M. Leung, K. Cheung, R. W. Wu, Z. Huang, and E. S. M. Chu, “38P Hormonal modulation of photodynamic therapy efficacy in breast cancer 3D spheroid culture model,” *Annals of Oncology*, vol. 33, p. S1444, Nov. 2022, doi: 10.1016/j.annonc.2022.10.048.

[39] E. Kowolik *et al.*, “Preclinical Photodynamic Therapy Targeting Blood Vessels with AGuIX® Theranostic Nanoparticles,” *Cancers (Basel)*, vol. 16, no. 23, Dec. 2024, doi: 10.3390/cancers16233924.

[40] L. Pedrosa *et al.*, “Preclinical Studies with Glioblastoma Brain Organoid Co-Cultures Show Efficient 5-ALA Photodynamic Therapy,” *Cells*, vol. 12, no. 8, Apr. 2023, doi: 10.3390/cells12081125.

[41] I. Yakavets, A. Francois, A. Benoit, J. L. Merlin, L. Bezdetnaya, and G. Vogin, “Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-78087-7.

[42] M. G. McCoy *et al.*, “Endothelial cells promote 3D invasion of GBM by IL-8-dependent induction of cancer stem cell properties,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-45535-y.

[43] G. Lazzari, V. Nicolas, M. Matsusaki, M. Akashi, P. Couvreur, and S. Mura, “Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity,” *Acta Biomater*, vol. 78, pp. 296–307, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.008.

[44] A. S. Nazarenko *et al.*, “Viral-Porphyrin Combo: Photodynamic and Oncolytic Viral Therapy for Potent Glioblastoma Treatment,” *Int J Mol Sci*, vol. 25, no. 23, Dec. 2024, doi: 10.3390/ijms252312578.