

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



Diplomová práce

**Vývoj 3D sférických buněčných modelů odvozených od nádorových buněčných kultur
vhodných pro studium fotodynamické terapie**

Bc. Lenka Brieslingerová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, podnětné připomínky, přátelský přístup a trpělivost. Velké poděkování patří také kolektivu Katedry biochemických věd a Mgr. Janu Kollárovi za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu během celého mého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Lenka Brieslingerová

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj 3D sférických buněčných modelů odvozených od nádorových buněčných kultur vhodných pro studium fotodynamické terapie

Vzhledem k celosvětově narůstajícímu počtu nádorových onemocnění je stále velká snaha zefektivnit jejich léčbu. Běžně je testování nově vyvíjených léčiv prováděno na kulturách nádorových buněk rostoucích v monovrstvě. Použití 3D sféroidních modelů však poskytuje vhodnější způsob testování, jelikož tyto modely dokáží lépe napodobit vlastnosti *in vivo* nádorů a poskytnout tak reálnější odezvu na podaná léčiva. 3D sféroidní modely mohou být využity kromě testování nových cytostatik také jako nádorové modely pro studium účinku fotodynamické terapie (PDT), ač tento model stále není v tomto oboru příliš rozšířen. PDT je alternativní minimálně invazivní léčebná metoda nejen pro nádorová onemocnění. Využívá fotosenzitizéru (PS), molekulárního kyslíku ($^3\text{O}_2$) a světla k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které následně poškozují nádorovou tkáň.

Tato práce se zabývala zhotovením 3D sféroidních buněčných kultur z HeLa buněčné linie, které byly následně použity k dalším pokusům, včetně PDT. Sféroidy byly vytvořeny metodou visuté kapky a metodou využívající destičky s velmi nízkou adhezivitou (ULA). Pro tvorbu optimálních a jednotných sféroidů byla jako vhodnější vyhodnocena metoda s použitím ULA destiček, která taktéž umožňovala dlouhodobou kultivaci a jednodušší přípravu uniformnějších a pravidelnějších sféroidů. Pro dosažení kompaktnějších sféroidů vytvořených visutou kapkou bylo vyzkoušeno dodání extracelulární matrice (ECM) ve formě kolagenu, avšak jeho pozitivní vliv nebyl v našem experimentu s HeLa buňkami prokázán.

K vyhodnocování účinnosti PDT byl použit biochemický test životaschopnosti s využitím resazurinu. Pro použití testu bylo nutné optimalizovat inkubační dobu resazurinu se sféroidy, kdy jsme jako ideální čas zvolili 4 hodiny. Jako PSs pro studium účinnosti PDT na sféroidech byly použity nově syntetizované amfifilní látky ze skupiny ftalocyaninů (Pc). Kladně nabitá látka P40 vykazala vyšší fotodynamickou aktivitu než záporně nabitá látka P44. Práce se také zabývala optimalizací postupu barvení sféroidů pro jejich zobrazení konfokální mikroskopií. Byl taktéž zaveden test invazivity a migrace.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Lenka Brieslingerová
Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.
Title of diploma thesis: Development of 3D spheroid cell culture derived from tumor cell lines suitable for photodynamic therapy research

Growing number of tumorous diseases worldwide is urging great effort to make anticancer treatment more effective. Conventional testing of newly developed drugs is performed on tumor cell cultures growing in a monolayer. However, the use of 3D spheroid models provides a more appropriate method of testing, as these models are able to better mimic the *in vivo* properties of tumors and thus provide a more realistic response to administered drugs. In addition to testing new cytostatics, 3D spheroid models can also be used as tumor models to study the effect of photodynamic therapy (PDT), although this model is still not widely utilized in the field of PDT research. PDT is an alternative and minimally invasive treatment method used not only to treat tumors. It utilizes a photosensitizer (PS), molecular oxygen ($3O_2$) and light to form reactive oxygen species (ROS), consequently damaging tumor tissue.

This diploma thesis deals with the production of 3D spheroid cell cultures from the HeLa cell line, which were consequently used for further experiments, including PDT. Spheroids were formed by the hanging drop method and ultra-low adhesion (ULA) environment method. For the formation of optimal and uniform spheroids, the method using ULA plates was evaluated as more suitable. ULA plates have also enabled long-term cultivation and easier preparation of more uniform spheroids. To obtain more compact spheroids formed by a hanging drop method, the utilization of extracellular matrix proteins in the form of collagen was examined, but its positive effect was not demonstrated in our experimental setup with HeLa cells.

A biochemical viability assay using resazurin was used to evaluate the efficacy of PDT. To utilise this assay, it was necessary to optimize the incubation time with resazurin. 4 hour incubation time was chosen as the ideal period. Newly synthesized amphiphilic compounds from the group of (aza)phthalocyanines were used as PSs to study the efficacy of PDT on spheroids. The positively charged compound P40 showed a higher photodynamic activity than the negatively charged compound P44. The work also dealt with the optimization of the process of staining spheroids for their imaging by the laser scanning confocal microscopy. 3D spheroid invasion assay (spheroid sprouting assay) and migration assay (spreading assay) were also introduced.

1 OBSAH

1	OBSAH.....	8
2	ÚVOD.....	11
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1	Nádorová onemocnění.....	12
3.1.1	Příčiny vzniku nádorů.....	12
3.1.2	Klasifikace nádorů.....	13
3.1.3	Stavba nádorů.....	13
3.2	3D buněčné kultury.....	14
3.2.1	Historie 3D kultivace.....	15
3.2.2	Rozdíly ve 3D a 2D kultivaci.....	15
3.2.3	Proces tvorby sféroidů.....	18
3.2.4	Způsoby vytváření sféroidů (typy 3D modelů).....	19
3.2.5	Využití 3D kultur.....	27
3.3	Fotodynamická terapie (PDT).....	34
3.3.1	Princip PDT.....	34
3.3.2	Fotosenzitizér (PS).....	36
3.3.3	Světelné zdroje.....	37
3.4	Využití 3D kultur ve výzkumu PDT.....	38
3.4.1	Nanoterapie.....	38
4	CÍLE PRÁCE.....	40
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
5.1	Laboratorní vybavení pro práci s buněčnou linií.....	41
5.1.1	Pracovní pomůcky.....	41

5.1.2	Pracovní přístroje.....	42
5.1.3	Použité chemické látky a reagensie.....	43
5.2	Buněčná linie HeLa	44
5.2.1	Kultivační médium	44
5.2.2	Pasážování buněk	44
5.2.3	Stanovení počtu životaschopných buněk.....	45
5.3	Tvorba 3D sféroidů.....	46
5.3.1	Vytvoření buněčné suspenze pro nasazení buněk	46
5.3.2	Metoda visuté kapky.....	47
5.3.3	Využití ULA destiček.....	48
5.4	Pozorování růstu a uniformity sféroidů	49
5.5	Testy životaschopnosti buněk.....	51
5.5.1	Stanovení optimální doby inkubace AlamarBlue™ se sféroidy	52
5.5.2	Porovnání citlivost AlamarBlue™, AlamarBlue™ HS, PrestoBlue™	52
5.6	Fototoxicita vybraných fotosenzitizérů	53
5.6.1	Využití Xe výbojky jako zdroje záření.....	54
5.6.2	Využití laserové diody jako zdroje záření	55
5.7	Statistické zpracování dat	55
5.8	Konfokální mikroskopie	56
5.9	Test invazivity a migrace.....	57
6	Výsledky.....	58
6.1	Stanovení optimální počáteční koncentrace buněk pro tvorbu sféroidů.....	58
6.2	Využití kolagenu jako nástroje pro tvorbu kompaktnějších sféroidů.....	60
6.3	Sledování růstu sféroidů	62
6.4	Vliv výměny média na růst sféroidů v ULA destičce	67
6.5	Uniformita sféroidů	68
6.6	Optimalizování času inkubace sféroidů s AB.....	71

6.7	Porovnání citlivost AlamarBlue™, PrestoBlue™, AlamarBlue™ HS	72
6.8	Fotodynamická aktivita	73
6.8.1	Využití Xe výbojky jako zdroje záření.....	73
6.8.2	Využití laserové diody jako zdroje záření	75
6.9	Zobrazení sféroidu konfokální mikroskopií	77
6.10	Invazivní a migrační potenciál sféroidů vytvořených z HeLa buněčné linie 81	
7	ZÁVĚRY	86
8	DISKUZE	87
9	SEZNAM ZKRATEK	93
10	POUŽITÁ LITERATURA	95

2 ÚVOD

Téma diplomové práce „Vývoj 3D sférických buněčných modelů odvozených od nádorových buněčných kultur vhodných pro studium fotodynamické terapie“ jsem si vybrala především proto, že se jedná o velmi aktuální téma. Testování nových látek a léčebných přístupů podílejících se na boji s nádorovými onemocněními patří vzhledem k jejich narůstajícímu výskytu k velmi důležité oblasti výzkumu. Nádorové sféroidy díky vhodnému mikroprostředí poskytují optimální podmínky pro testování a umožňují upuštění od tradičních postupů, při kterých jsou k experimentům využívány dvourozměrné (2D) buněčné kultury či laboratorní zvířata.

Využití trojrozměrných (3D) sférických modelů je uplatňováno i ve vývoji fotodynamické terapie (PDT). Jedná se o poměrně moderní, minimálně invazivní metodu léčby nádorových a některých dalších onemocnění. PDT spočívá v podání fotosenzitizeru (PS), jenž se cíleně hromadí v nádorové tkáni. Následným ozářením PS dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS), které se kromě přímého poškození buněk nádorové tkáně podílejí na destrukci cévního zásobení nádoru a indukci zánětlivé reakce.

V teoretické části jsou popsány hlavní charakteristiky 3D modelů, především výhody, které tyto modely poskytují ve srovnání s klasickými 2D buněčnými kulturami a možné způsoby jejich tvorby v laboratorních podmínkách. Dále jsou zde zmíněny různé oblasti, v kterých jsou 3D modely využívány včetně již zmíněné PDT.

Praktická část se zabývá porovnáním dvou metod, pomocí nichž lze sféroidy vytvořit a to metodou visuté kapky a metodou využívající speciální destičky s velmi nízkou adhezivitou (ULA). Jsou zde zkoumány také podmínky, které mohou tvorbu sféroidů ovlivnit jako například přidání kolagenu či výměna média během jejich růstu. Na sféroidech zhotovených ULA destičkou byla testována účinnost PDT, kde byly jako PSs použity nově syntetizované látky ze skupiny ftalocyaninů (Pc). Provedli jsme také optimalizaci postupu pro vizualizaci sféroidů konfokální a fluorescenční mikroskopií. Mimo to byl zkoumán invazivní a migrační potenciál sféroidů tvořených z buněčné linie HeLa.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění patří k jedné z nejčastějších příčin úmrtí na celém světě. Jejich výskyt se zvyšuje především v rozvinutých zemích, kde dochází k prodlužování věku populace, díky zdokonalování zdravotnické péče a zlepšování životních podmínek. Projevují se v každém věku, nejvíce však v dospělosti a ve stáří (Kopecký & Krejsek, 2004).

Jako nádor neboli tumor označujeme populaci abnormálních buněk, které rostou a chovají se nezávisle na kontrolních mechanismech organismu. Jedná se vždy o ireverzibilní změnu tkáně, kdy se patologické chování projevuje i přesto, že původní příčina vzniku nádoru již nepůsobí (Stříteský, 2001).

3.1.1 Příčiny vzniku nádorů

Příčina vzniku nádoru ještě není plně objasněna. Jedná se však o multifaktoriální progresivní proces, trvající mnohdy až desítky let, který je způsoben změnou genů řídících růst a zrání buněk. Tyto změny vedou mj. k přeměně protoonkogenů na onkogeny, které podporují transformaci buněk na nádorové.

Mezi dosud známé faktory podílející se na nádorovém bujení patří chemické látky, jinak nazývané také karcinogeny. Jedná se především o deriváty aromatických uhlovodíků a dehet, dále také vinylchlorid či aflatoxin. Mezi významné karcinogeny řadíme také tabákový kouř, který přispívá k nádorovému onemocnění průdušek a plic. U kuřáků se jeho podíl odhaduje až na 85% (Stříteský, 2001).

Ionizační záření ohrožuje vznikem nádorů všechny typy tkání. Vliv ultrafialového záření byl prokázán především při vzniku nádoru rtů a kůže. Rizikové je také nadměrné RTG a radioaktivní záření využívané ve zdravotnictví. (Šteiner & Povýšil, 2012).

Viry mohou vyvolávat u lidí vznik různých typů nádorů. Prokazatelný je vliv papilomavirů spolu s virem z čeledi *Herpesviridae* na karcinomu děložního hrdla. Virus Epstein-Barrové, původce infekční mononukleózy, se může podílet na vzniku Burkittova lymfomu či některých T-lymfomů. Také pacienti nakažení virem HIV, způsobující onemocnění AIDS, jsou ve větší míře ohroženi vznikem lymfomů (Šteiner & Povýšil, 2012).

Kromě výše zmíněných mohou rozvoj nádoru podpořit také dietické zvyklosti či vliv hormonů. V neposlední řadě se uplatňuje taktéž dědičné faktory (Stříteský, 2001).

3.1.2 Klasifikace nádorů

Nádory můžeme dělit na základě jejich chování k organismu na maligní a benigní. Menší riziko pro organismus představují nádory benigní, které rostou pomalu, jsou ohraničené a jejich případné chirurgické odstranění nebývá náročné. Mezi vlastnosti benigních nádorů patří expanzivní růst, čímž dochází k utlačování okolní tkáně, atrofii nenádorových buněk a vzniku vazivového pouzdra kolem nádoru. Jako maligní, či zhoubné, se uvádějí neohraničené nádory s agresivním růstem, které se šíří do okolí a často tvoří recidivující metastázy lymfogenní či hematogenní cestou.

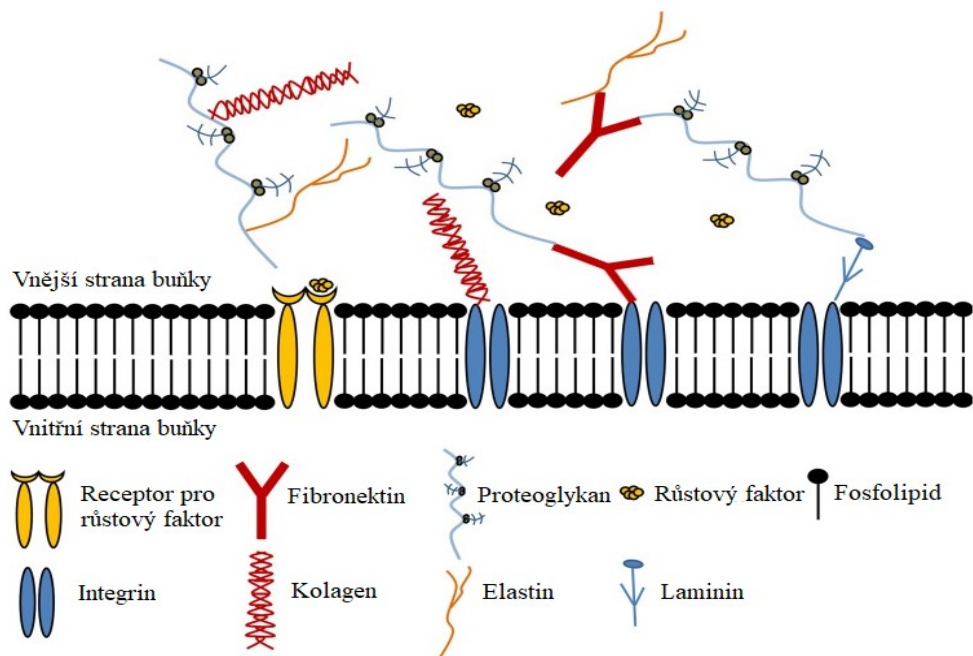
Dále můžeme rozlišovat novotvary dle tkáně, ze které vznikají na mezenchymové (z tkání pojivových, tukových, svaloviny, cév), epitelové (z epitelu krycího či žlázového), neuroektodermové (z nervové tkáně, dřene nadledvin, melanocytů), germinální (prekursorů pohlavních buněk) a nádory trofoblastu (z tkáně pokrývající klky placenty) (Stříteský, 2001).

3.1.3 Stavba nádorů

Nádory jsou tvořeny složkami extracelulární matrix (ECM) a různými typy buněk. Kromě nádorových buněk zde lze nalézt buňky stromální, mezi které řadíme například fibroblasty, cévní buňky a buňky imunitního systému. Stromální buňky mají vliv na progresi nádoru a farmakologickou odpověď, jelikož slouží jako zdroj cytokinů a růstových faktorů (Trujillo-de Santiago, 2019).

ECM byla dříve považována pouze za strukturální podporu buněk, dnes je však známo, že její složky taktéž ovlivňují buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci, adhezi, organizaci cytoskeletu a buněčnou signalizaci. Mezi složky ECM patří proteiny (např. kolagen, elastin), glykoproteiny (např. fibronectin), glykosaminoglykany (např. heparan sulfát), proteoglykany (např. syndekan), ECM uvolňované růstové faktory (např. vaskulární endotelový růstový faktor) a jiné sekretované proteiny (např. proteolytické enzymy). Připojení buněk k ECM je zajištěno pomocí integrinů a intracelulárních signálů (Obr. 1), které buňky produkují. Integriny patří mezi transmembránové receptory usnadňující vzájemný kontakt

mezi ECM a aktinovým cytoskeletem během buněčné motility a adheze. Vazba integrinů je zprostředkována jejich extracelulární doménou, která rozpoznává ligandy. Typický ligand je například motiv Arg-Glyc-Asp (RGD) nacházející se na fibronektinu (Ahmed et al., 2019).



Obrázek 1. Interakce buněk s ECM. Upraveno z (Ahmed et al., 2019).

3.2 3D buněčné kultury

Buněčná kultura je významným nástrojem pro vědecké studie. Stále je nejvíce využívána 2D kultivace, která našla své uplatnění od začátku 20. století. Vylepšené vlastnosti však přináší kultivace buněk ve 3D prostředí, která přesněji napodobuje podmínky *in vivo* a umožňuje tak optimální růst, diferenciaci a funkci buněk. 3D kultivace buněk se uplatňuje především pro výzkum nádorů, objevování nových léčiv, v tkáňovém inženýrství a také pro modelování některých onemocnění (Jensen & Yong, 2020).

3D kultury lze vytvořit několika způsoby. Zatímco při vytváření 2D kultur buňky rostou na rovném povrchu ze skla či plastu, při tvorbě 3D struktur se nejčastěji buňky shlukují do agregátu s pomocí či bez pomoci tzv. nosiče (matrice, scaffold). Tyto agregáty buněk označujeme jako sféroidy. Vhodnou metodou lze vytvořit sféroidy velké od několik desítek mikrometrů až po milimetrové rozměry. V průměru však tyto avaskulární útvary obvykle

dosahují několik stovek μm (Edmonson et al., 2014, Fennema et al., 2013, Thakuri et al., 2018).

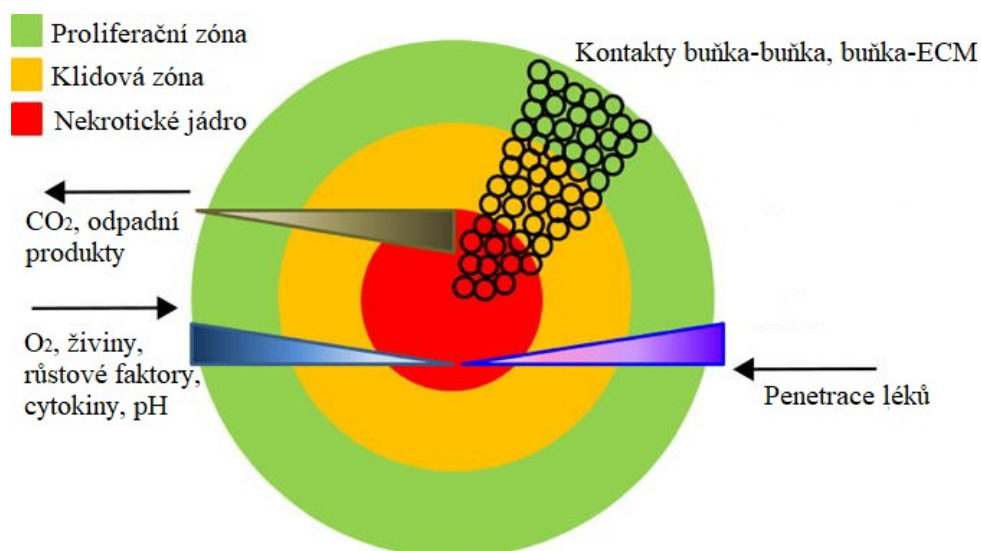
3.2.1 Historie 3D kultivace

Historie 3D kultivace sahá do padesátých let minulého století, avšak termín sféroid je znám až od roku 1971, kdy Robert Southerland a jeho kolegové při svém výzkumu použili plicní karcinomové buňky čínského křečka za vzniku pravidelných kulatých útvarů. Ve svém výzkumu popsali také rozdíly v oxygenaci a růstu buněk ve sféroidu a stanovili růstovou frakci po léčbě cytostatiky či ozáření. V 80. letech 20. století Mina Bissel a její tým poukázali na významnost ECM spolu s mikroprostředím a začali propagovat používání 3D technik pro přesnější porovnání buněčných modelů s *in vivo* prostředím (May, 2018).

3.2.2 Rozdíly ve 3D a 2D kultivaci

3.2.2.1 Rozdílné zóny proliferace

Sféroidy jsou známé přítomností interakcí buňka-buňka a buňka-ECM. Díky těmto interakcím zde vznikají gradienty kyslíku, živin i katabolitů (Obr. 2). Malé sféroidy s velikostí 150 – 200 μm vykazují dobrou difuzi živin a kyslíku do celého útvaru. Sféroidy přesahující velikost 500 μm však vytváří několik zón složených z buněk nacházejících se v různých buněčných stádiích. Vnější vrstvy sféroidu jsou v kontaktu s médiem a nacházejí se zde tedy životaschopné proliferující buňky. Jádro sféroidu je díky velmi omezenému přísunu kyslíku, růstových faktorů a živin složeno z buněk hypoxických až nekrotických. Střední vrstvu tvoří buňky klidové (inaktivní, quiescentní). Naopak buňky kultivované v monovrstvě jsou vystaveny médiu rovnocenně, proto se obvykle nacházejí ve stejném stádiu buněčného cyklu (Edmonson et al., 2014, Zanoni et al., 2016).

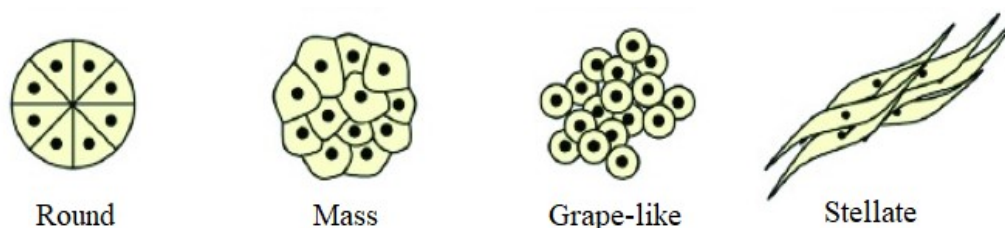


Obrázek 2. Zóny sféroidu. Upraveno z (ShilpaSant & Johnston, 2017).

3.2.2.2 Morfologie

Další z významných rozdílů nacházíme v morfologii buněk. Buňky ve 2D kulturách jsou oproti buňkám ve 3D kulturách více ploché a natažené.

Při 3D kultivaci 25 buněčných linií nádoru prsu byly popsány čtyři různé morfologické struktury (Obr. 3): pravidelný kulatý sféroid (round), neohraničený kulatý sféroid (mass), hroznovitý (grape-like) a hvězdicovitě protáhlý (stellate). Zjistilo se také, že morfologie 3D sféroidů je závislá na buněčné linii a na typu použitého modelu. Morfologickou strukturu sféroidu může ovlivňovat i zdroj, ze kterého byly buňky získány. Například metastatické buňky buněčných linií kolorektálního karcinomu vytvářely sféroid s hroznovitou morfologickou strukturou, přestože buňky z primárního nádoru se formovaly do neohraničeného kulatého sféroidu. (Edmonson et al., 2014, Nath & Devi, 2016).



Obrázek 3. Morfologické struktury sféroidů. Převzato z (Edmonson et al., 2014).

3.2.2.3 Proliferace

Rychlost proliferace buněk ve 3D prostředí je ovlivněná buněčnou linií a typem buněčného modelu. Obvykle se však buňky ve 2D kulturách množí rychleji než buňky ve 3D kulturách. Pomalejší proliferace je způsobená nižší dostupností živin a růstových faktorů z média a také tím, že při využití nosiče pro 3D kultivaci je při proliferaci buněk nutné jeho proteolytické štěpení (Baker & Chen, 2012).

3.2.2.4 Exprese genů a proteinů

Zploštění buněk ve 2D kultuře vede k cytoskeletálním změnám a umělé polaritě buněk, což způsobuje odlišnou expresi genů a proteinů, které hrají roli v buněčné adhezi, proliferaci, migraci, invazivitě a chemosenzitivitě.

Například Loessner et al. popsali ve 3D kultuře zvýšenou expresi povrchových buněčných proteinů alfa 3, alfa 5 a p1 integrinů. Zvýšená byla také exprese proteázy MMP9 v nádorových buňkách vaječníků ve srovnání s buňkami ve 2D kultuře (Baker & Chen, 2012, Hoarau-Véhot et al., 2018).

3.2.2.5 Životaschopnost

Bylo zjištěno, že buňky ve 3D kultuře jsou životaschopnější a odolnější k poškození a indukci buněčné smrti ve srovnání s 2D kulturou. To je způsobeno výraznějšími interakcemi mezi buňkami v trojrozměrné kultuře. Uvádí se, že tyto buňky jsou životaschopné až 4 týdny, naopak buňky v monovrstvě pouze jeden týden. Poté je nutné jejich pasážování pro poskytnutí dostatku živin. 3D modely jsou tedy výhodnější pro experimenty trvající delší dobu (např. stanovení dlouhodobých účinků léčiv) (Antoni et al., 2015, Gupta et al., 2016).

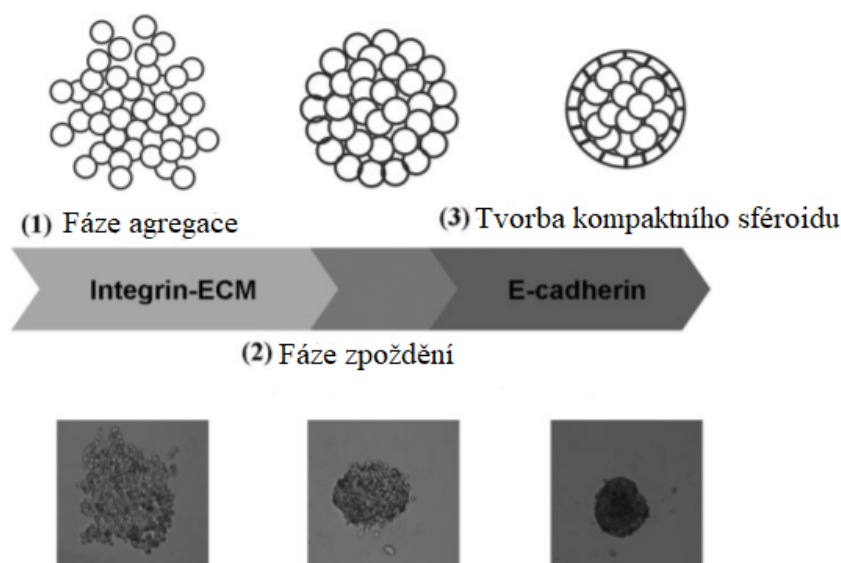
3.2.2.6 Citlivost na léky

Cytostatika testovaná na 2D buněčných kulturách poskytují často velkou protinádorovou účinnost, přestože následně v *in vivo* podmínkách je nádor na tuto medikaci rezistentní a dochází k selhávání terapie a častému relapsu onemocnění. 3D kultury mají větší predikční schopnost v protinádorové terapii, a to hned z několika důvodů.

Prvním z nich je již výše zmíněná rozdílná morfologie buněk v kulturách. S ní souvisí rozdílná exprese a struktura povrchových receptorů. Jelikož buňky ve 2D kultuře jsou obvykle stresované, dochází také ke změně exprese genů a proteinů podílejících se na působení cytostatik. Jeden z dalších důvodů je, že ve 2D kultuře nacházíme buňky pouze v proliferačním stádiu, naopak buňky ve 3D kultuře se nacházejí v různých stádiích. Některá léčiva jsou však zaměřena především na prolifерující buňky, takovými léčivy jsou například 5-fluorouracil či doxorubicin. Při nedostatku prolifерujících buněk v kulturách, byla potvrzena až stoprocentní rezistence na tato léčiva. Další důvod spočívá v rozdílné dostupnosti buněk pro léčivo. Zatímco pro buňky kultivované ve 2D kultuře je léčivo dostupné rovnocenně, proniknutí léčiva k buňkám nacházejících se uvnitř sféroidu bývá ve 3D kulturách obtížné. Často se tak objevují různé zóny koncentrací léčiva ve sféroidu v závislosti na hloubce, kde se buňky nacházejí. Souvislost s účinností léčiva má i pH, které klesá směrem dovnitř sféroidu. Byla potvrzena rezistence na léčiva se slabě bazickým charakterem, jako je doxorubicin, a to díky snížené absorpci při nízkém pH (Edmonson et al., 2014).

3.2.3 Proces tvorby sféroidů

Tvorba sféroidu probíhá ve třech hlavních krocích (Obr. 4). Nejprve dochází k rychlé agregaci buněk rozptýlených v suspenzi pomocí dlouhých vláken ECM, které obsahují více RGD motivů umožňujících vazbu integrinů. Po této fázi nastává fáze zpoždění, při které dochází ke zvýšené expresi transmembránových proteinů kadherinů, které slouží pro tvorbu spojů mezi buňkami. Ve třetí fázi dochází k formování sféroidu vytvářením silných kadherinových vazeb mezi buňkami (Lin & Chang, 2008).



Obrázek 4. Tvorba sféroidu. Upraveno z (Lin & Chang, 2008).

3.2.4 Způsoby vytváření sféroidů (typy 3D modelů)

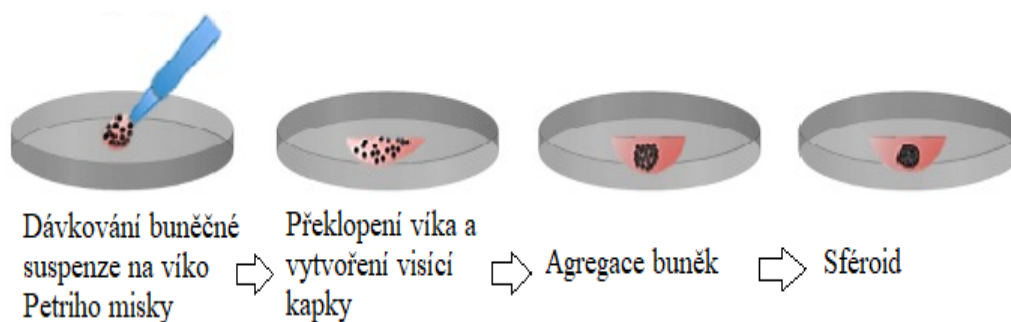
K vytvoření sféroidů se používá několik dosud známých metod. Vždy je nutné zvolit nejvhodnější 3D model pro konkrétní aplikaci. Metody nezávislé na ukotvení (bez dodání opěrné struktury) lépe modulují buněčné a fyziologické gradienty. Naopak metody závislé na ukotvení snadněji napodobují interakci buněk s ECM (Langhans, 2018).

3.2.4.1 Metody nezávislé na ukotvení

Metody nezávislé na ukotvení jsou založeny na principu spontánní agregace buněk. Zohledňují především interakce buňka-buňka, pokud ale buňky syntetizují vlastní ECM, dochází zde také k přirozené interakci mezi ECM a buňkami. Velikost vzniklých sféroidů je závislá na počátečním počtu naočkovaných buněk a době kultivace. Jejich pěstování je možné do velikosti, při které sféroidy vykazují gradienty kyslíku a živin podobné tkáni. Patří k nejstarším metodám, přesto jsou využívány nejčastěji, a to především pro jejich jednoduchost a nízkou cenu (Langhans, 2018, Shilpa Sant & Johnston, 2017).

3.2.4.1.1 Visutá kapka

Jedná se o poměrně jednoduchou metodu nevyžadující speciální materiál ani přístrojové vybavení, při které vznikají sféroidy s kontrolovaným počtem buněk a velikostí. V relativně husté suspenzi buněk zde dochází ke spontánní agregaci ve spodní části kapky následkem gravitace po převrácení buněčné suspenze a inkubaci. Tento model je možné vytvářet např. v kultivačních destičkách či v Petriho miskách (Obr. 5). Výhodou této metody je vytvoření sféroidu i z malého počtu buněk, což je využíváno především při manipulaci se vzácnými a unikátními buňkami pocházejícími přímo od pacienta. Tato metoda má však omezené pracovní objemy a to na 20 až 50 μl suspenze. Z tohoto důvodu je nutná častá a pracná výměna média pro zabránění dehydratace sféroidů, ke které obvykle dochází během deseti až patnácti dnů (Hoarau-Véchet et al., 2018).



Obrázek 5. Visutá kapka. Upraveno z (Hoarau-Véchet et al., 2018).

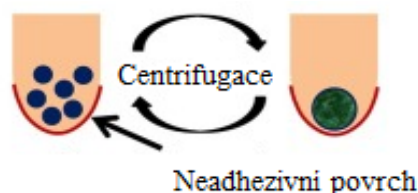
Novější technologie umožňují snadnou tvorbu sféroidů pomocí visutých kapek ve velkém měřítku. Například společnost 3D Biomatrix poskytuje 96 či 384-jamkové závěsné desky, společnost InSphero pak desky s 96-jamkovým formátem. Tyto desky mají ve spodní části kapalinu udržující vlhké prostředí uvnitř desky, které zabraňuje vysychání kapky. Víko obsahuje přístupové otvory, pomocí kterých je možné přidat buněčnou suspenzi pro vytvoření kapky a následnou snadnou výměnu média. Přesto zde přetrvává nemožnost touto metodou vytvořit velké sféroidy (Fennema et al., 2013, Hoarau-Véchet et al., 2018, Petrenko et al., 2017).

3.2.4.1.2 Destičky s velmi nízkou adhezivitou (ULA)

Při této metodě se zabraňuje ulpění buněk na povrchu destičky, čímž je zajištěn vznik agregátů (Obr. 6). K tomu dochází několika modifikacemi. Mezi jednu z nich patří potažení povrchu destičky polyhydroxyethylmethakrylátem (poly-HEMA), pro kterou se obvykle

používá 96-jamková destička. Další levnější alternativou je použití agarózy (Gupta et al., 2016).

Na rozdíl od metody visuté kapky, mají tyto 96 nebo 384-jamkové destičky větší objemovou kapacitu, je tedy možné vložit větší počáteční objem suspenze, a není tak nutná další manipulace se sféroidy, pokud je potřeba delší kultivace. Tato metoda však může být poměrně časově náročná, protože se pro potahování desek musí polymer nejprve rozpustit a autoklávovat. Jsou však dostupné již komerčně dodávané destičky, Petriho misky či kultivační lahve s nepřilnavým povrchem např. od firem PrimeSurface, Lipidure, Sumitomo Bakelite či Thermo Fisher Scientific. Pořizovací cena bývá výrazně vyšší v porovnání s deskami potahovanými vlastními silami, stále se však jedná o mnohem levnější variantu, než jsou komerční systémy pro visuté kapky (Gupta et al., 2016, Hoarau-Véchet et al., 2018, Langhans, 2018, Weiswald et al., 2015).



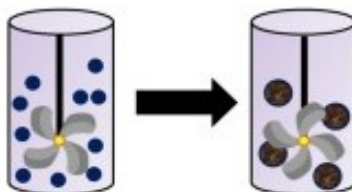
Obrázek 6. ULA jamka. Upraveno z (Gupta et al., 2016).

3.2.4.1.3 Metody založené na agitaci (rotační buněčný kultivační systém)

Použití této metody spočívá ve vložení buněčné suspenze do bioreaktoru, kde je zajištěno její jemné míchání a udržení buněk v pohybu. Díky tomu nedochází k přilnutí buněk na stěny kontejneru, ale k podpoře interakcí mezi buňkami. Na tomto principu pracují bioreaktory typu míchané baňky (spinner flask bioreactor; rotace míchadla uvnitř bioreaktoru), rotační buněčný kultivační systém (rotating wall bioreactor; rotace celého bioreaktoru) a některé další nepříliš populární bioreaktory jako například rotační perfuzní systém a kompresní bioreaktor (Gupta et al., 2016, Hoarau-Véchet et al., 2018).

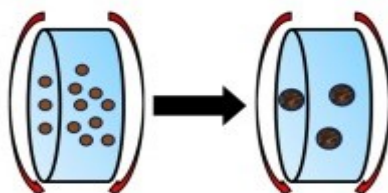
Míchané baňky obsahují nádobu (jejíž velikost může být různá, v závislosti na požadované velikosti sféroidu) a míchadlo, které nepřetržitě promíchává buněčnou suspenzi (Obr. 7). Je zde umožněna dlouhodobá kultivace buněk díky možnosti pravidelné a snadné výměny kultivačního média, a tedy kontinuálnímu poskytování živin a odstraňování odpadních produktů. Nevýhody spočívají ve velké spotřebě média, vzniku různě velkých

sféroidů a taky možnosti narušení fyziologie buněk, které může být výsledkem samotného míchání (Hoarau-Véhot et al., 2018).



Obrázek 7. Míchaná baňka. Převzato z (Gupta et al., 2016).

Rotující bioreaktory se od míchané baňky liší v absenci míchadla. Pohyb buněčné suspenze je zajištěn rotací celého kontejneru pro kultivaci (Obr. 8). Nejprve se nádoba otáčí nízkou rychlostí, jakmile však dojde k vytvoření větších agregátů, rychlost otáčení se zvyšuje, pro udržení sféroidů v suspenzi. Metoda je jednoduchá, snadná a umožňuje taktéž dlouhodobou kultivaci. Existuje zde ale také velká variabilita velikostí sféroidů (Gupta et al., 2016).



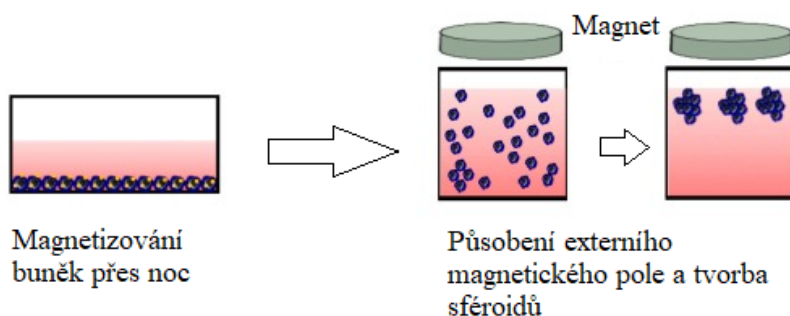
Obrázek 8. Rotující bioreaktor. Převzato z (Gupta et al., 2016).

3.2.4.1.4 Metoda magnetické levitace

Jedná se o novější techniku, při které se buňky předem naplní magnetickými nanočásticemi. Poté působením externího magnetického pole dochází k nadnášení buněk směrem k rozhraní vzduch/kapalina na desce s nízkou adhezí, čímž se podpoří interakce mezi buňkami a následný vznik sféroidů obvykle během několika hodin (Obr. 9) (Hoarau-Véhot et al., 2018, Langhans, 2018).

Existuje mnoho výhod, které tato metoda poskytuje. Po agregaci buněk zde dochází k tvorbě ECM, tudíž není potřeba umělého nosiče. Sféroidy zde rostou rychleji a jejich velikost je v rozsahu mm^2 . Tato velikost lépe moduluje nekrotickou a hypoxickou oblast,

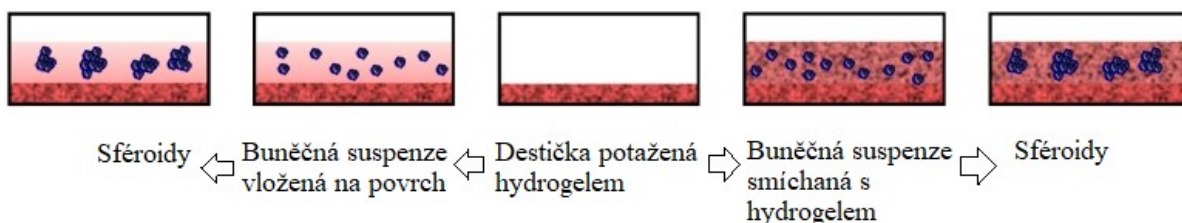
kteří se nachází v nádorech. Metoda je však drahá a nanočástice mohou mít toxický účinek na buňky (Hoarau-Véhot et al., 2018).



Obrázek 9. Magnetická levitace. Upraveno z (Hoarau-Véhot et al., 2018).

3.2.4.2 Metody závislé na ukotvení

Tyto metody využívají tzv. nosiče (scaffold), které poskytuje buňkám fyzickou oporu. Nosič může být tvořen různými jednoduchými podpurnými strukturami nebo se využívají gelové matrice napodobující ECM. Buňky mohou být vloženy dovnitř mikroporézního gelu nebo na jeho povrch (Obr. 10). Mikroporézní gel buňkám umožňuje přilnout, ukotvit se, šířit se a migrovat ve 3D prostředí. Gelové matrice mohou být jak přírodního původu, tak syntetické (Langhans, 2018, Shilpa Sant & Johnston, 2017).



Obrázek 10. Tvorba sféroidů pomocí lešení. Upraveno z (Hoarau-Véhot et al., 2018).

Nevýhody těchto metod jsou tvorba nestejných sféroidů, nákladná výroba ve velkém měřítku a také variabilita šarží. Homogenní velikosti sféroidů můžeme dosáhnout použitím měkké litografie, kdy se vytvoří mikrojamky přesně definované velikosti a tvaru, v nichž dochází ke kultivaci sféroidů (Gupta et al., 2016).

3.2.4.2.1 Přírodní nosiče

Přírodní nosiče bývají hydrogely obsahující převážně vodu a složky jako jsou kolagen I, agaróza, elastin, laminin či kyselina hyaluronová. Díky vysokému objemu přebytečné tekutiny však neposkytují velkou mechanickou oporu. Navíc nízká hustota matrice nekoreluje s prostředím obklopujícím buňky *in vivo*. Tento problém lze odstranit vložením absorbéru pro extrakci tekutiny z hydrogelu. Díky odstranění nadbytečné tekutiny dojde ke zvýšení hustoty buněk a matrice. Hustota prostředí ovlivňuje morfologii i rychlost buněčného růstu. Vzhledem ke zvýšené tuhosti lešení po absorpci nadbytečné tekutiny pak dochází ke snížení difuze kyslíku a formování hypoxického jádra stejně jako v prostředí *in vivo* (Mohammad-Hadi et al., 2018).

Komerčně dostupný přírodní hydrogel je například Matrigel®, získaný z Engelbreth-Holm-Swarm myšího sarkomu. Obsahuje proteiny bazálních membrán, jako jsou kolagen IV, entaktin, laminin, perlecan, MMP2 a růstové faktory. Tyto proteiny jsou nezbytné pro polarizaci buněk, adhezi, regulaci růstu a chemoterapeutickou rezistenci. Matrigel® má však i své nevýhody jako jsou polymerace při teplotě nad 4 °C (a tudíž práce s předchlazeným spotřebním materiálem – špičky, destičky, média, samotné vzorky apod.), velká variabilita mezi šaržemi, která je způsobená nepřesně definovaným složením (získávání z biologického materiálu) a dále je zde riziko přenosu patogenu (Hoarau-Véchet et al., 2018, Knight. & Pryzborski, 2015, Serban & Prestwich, 2008, Snyder et al., 2011).

3.2.4.2.2 Syntetická lešení

Syntetická lešení jsou složena z polymerů, mezi které patří například polyethylenglykol (PEG), kyselina polymléčná a kyselina polyglykolová. Výhodná je jejich reprodukovatelnost a silnější mechanická struktura autentičtější biomolekulárním strukturám *in vivo*. Nevýhodou oproti přírodním gelům je však slabší buněčná adheze, jsou tak nutné např. povrchové úpravy gelu (Langhans, 2018, Mohammad-Hadi et al., 2018).

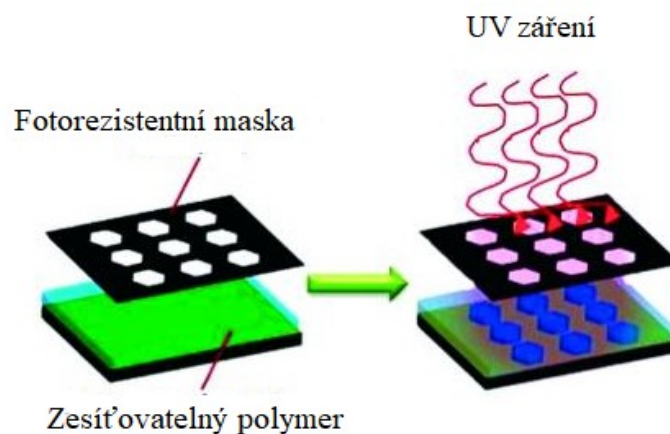
V některých syntetických lešeních mohou být růstové faktory, hormony nebo jiné biologicky aktivní molekuly pro zvýšení buněčné proliferace nebo podpoření specifického buněčného fenotypu (Langhans, 2018).

3.2.4.3 Mikrotechnologie

Mikrotechnologie patří k poměrně nedávným pokrokům v tvorbě 3D kultur a umožňují jejich využití ve velkém měřítku (Jamieson et al., 2015).

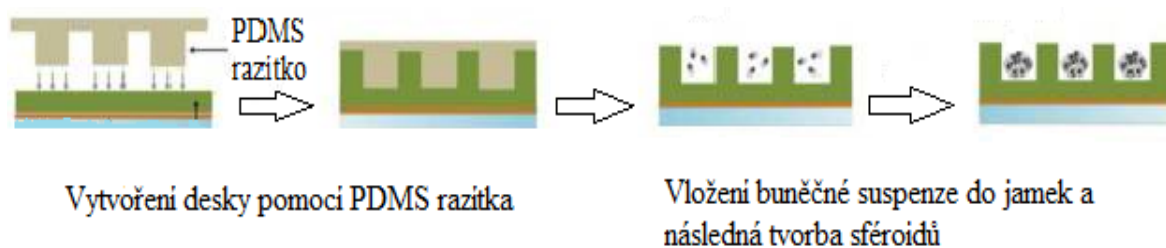
3.2.4.3.1 Mikropatterns

Kombinací hydrogelového prostředí s technologií mikrofabrikace vznikají destičky s předem definovanou velikostí a tvarem pro kultivaci sféroidů. Základní litografickou technologií je fotolitografie. Pro výrobu destičky jsou využívány různé přírodní i syntetické polymery, které je možno zesítovat za vzniku hydrogelů. K zesílení dochází vystavením destičky paprskům UV záření, které prochází skrz masku na fotocitlivý polymer za vzniku fotoreakce (Obr. 11) (El-Sherbiny & Jacoub, 2013, Kumacheva, 2018).



Obrázek 11. Fotolitografická příprava desky. Upraveno z (El-Sherbiny & Jacoub, 2013).

Pokročilejší metodou je pak měkká litografie (Obr. 12), která odstraňuje nevýhody konvenční fotolitografie jako jsou například nemožnost využití jiných než plochých silikonových substrátů, omezený výběr tvaru jamky či možnost v daném okamžiku vzorovat pouze malou oblast. V neposlední řadě je měkká litografie také levnější alternativou, přičemž fotolitografický proces je nutný pouze pro výrobu tzv. elastomerního vzorovaného razítka, pomocí kterého se desky formují. Nejvyužívanější organický polymer pro vytvoření razítka je polydimethylsiloxan (PDMS) (Lakshminarayanan, 2018, Nakanishi et al., 2008, Quist & Oscarsson, 2010).



Obrázek 12. Vytvoření desky pomocí měkké litografie. Upraveno z (Nath & Devi, 2016).

3.2.4.3.2 Mikrofluidní metody

Obvyklé metody pro 3D kultivaci s sebou nesou velké množství nedostatků jako různou velikost a tvar sféroidů. Není zde také přítomna klíčová úloha dynamického prostředí. Tyto vlastnosti mohou silně ovlivnit například účinnost a toxicitu léčiv při jejich vývoji. V této návaznosti vznikly v 90. letech mikrofluidní metody, také známé pod názvy Lab-on-a-chip nebo Micro Total Analysis System, které našly využití nejen ve 3D buněčné kultivaci a ve vývoji léčiv, ale také v proteinových studiích, tkáňovém inženýrství, detekci patogenů a mnoha dalších oborech (Gupta et al., 2016, Trujillo-de Santiago et al., 2019).

Tyto metody umožňují vytvořit chemický gradient, stejně jako tomu je v nádorech *in vivo*. Jejich výhoda spočívá i ve finanční stránce, protože se zde spotřebovává velmi malé množství vzorků (v řádu nanolitrů) a činidel. Mikrofluidní metody poskytují také možnost provedení několika kroků najednou (např. kultivace buněk, doplňování média, odstraňování odpadních látek, míchání) za udržení sterilních podmínek. Některé substráty sloužící pro výrobu mikrofluidních zařízení bývají propustné pro kyslík, což umožňuje lepší proliferaci a růst buněk uvnitř 3D kultury (Gupta et al., 2016, Trujillo-de Santiago et al., 2019).

V jednodušších systémech se kultivuje v jedné mikrofluidní komoře jeden typ buněk. Ve složitějších je umožněna interakce více typů buněk, kdy se mikrokanály navzájem spojují porézními membránami, které z každé strany ohraničuje jiný typ buněk. Takové prostředí umožňuje vytvořit nádory či orgány na čipu (Nath & Devi, 2016).

Mikrokanály se leptají na substráty ze skla či křemíku nebo se vytváří kombinací fotopolymerace a formováním hydrogelů (často PDMS) na základě měkké litografie (Gupta et al., 2016).

3.2.5 Využití 3D kultur

3.2.5.1 3D kultivace nádorových buněk

3D struktury nádorových buněk získávají čím dál větší popularitu, a to díky větší schopnosti 3D struktur napodobovat chování nádorů *in vivo*. Sféroidy mohou zahrnovat více než jeden druh buněk, a vytvářet tak mnohobuněčné nádorové sféroidy (MCTS) (Fennema et al., 2012, Mohammad-Hadi et al., 2018, Thakuri et al., 2018).

3.2.5.1.1 *Studium biologie nádorů*

Nádorové 3D modely mohou být složeny z buněk pocházejících z různých buněčných zdrojů, například z kmenových buněk, komerčně dostupných buněčných linií, patientských buněk, stromálních buněk, imunitních buněk aj. Využití sféroidy nachází při sledování růstu/proliferace nádorů, imunitních reakcí, intravazace, invaze, migrace, extravazace, metabolismu, angiogeneze a dostupnosti léčiv (Ham et al., 2016, Katt et al., 2016).

3.2.5.1.2 *Invaze a migrace*

Tvorba metastáz je složitý vícestupňový proces kaskádovitého průběhu. Nádorové buňky epiteliálního původu podstupují epiteliálně-mezenchymální přechod, při kterém dochází ke ztrátě buněčné adheze mezi buňkami a změně tvaru (Hoarau-Véhot et al., 2018, Jolly, 2015).

Po tomto kroku následuje invaze a migrace. Migrace představuje jednodušší proces, při kterém dochází k aktivnímu pohybu buňky kontrakcí, která je způsobena přestavbou cytoskeletu a jeho interakcí s myozinem. Invaze bývá komplikovanější, jelikož zahrnuje kromě procesu migrace také překonávání bariér a přestavbu okolního prostředí. Následuje intravazace buněk do lumen cév a jejich transport hematogenním či lymfatickým systémem do vzdálených míst. Je třeba poznamenat, že některé buňky schopné migrace nedisponují i schopností invaze (Friedl & Wolf, 2003).

Testy invaze ve 3D prostředí spočívají nejprve v generování sféroidů. Následně se sféroidy vloží do ECM. Nejpoužívanější ECM pro tuto metodu jsou Matrigel® a kolagen typu I. Jak už bylo zmíněno, při invazi dochází k přestavbě okolního prostředí a degradaci

ECM, což je zprostředkováno převážně metaloproteinázami. Buňky při tomto procesu vytváří tzv. invadopodia, které jsou charakterizována jako výběžky buněčné membrány bohaté na aktinová vlákna. Při invazi ze sféroidu invadopodia vystupují paprskovitě ve všech směrech. Ne všechny nádorové buňky toho jsou však schopné. Další možné testy invaze zahrnují využití modifikované Boydenovy komůrky (Berens et al., 2015, Nath & Davi, 2016, Thakuri et al., 2018, Vinci et al., 2012).

Test migrace s využitím sféroidů lze provést přenesením sféroidů z ULA destičky s kulatým dnem na povrch desek s plochým dnem potaženým želatinou. Každá jamka obsahuje jeden sféroid. Migrace přes povrch jamky (tedy ve 2D prostředí) je umožněna díky působení lamellipodií, což jsou ploché aktinové výběžky membrány buňky. K migraci dochází během několika hodin a sledovat ji lze až 72 hodin (Berens et al., 2015, Nath & Davi, 2016, Vinci et al., 2012, Yamaguchi & Condeelis, 2007).

3.2.5.1.3 Sledování hypoxie, oxidačního stresu a metabolismu nádorových buněk ve sféroidech

Ve MCTS větších než 500 μm vzniká následkem hypoxie a nedostatku ATP oxidační stres, při kterém se hromadí zvýšené množství ROS. To má za následek stimulaci HIF-1 α , který způsobuje metabolický přechod z mitochondriální oxidační fosforylace na aerobní glykolýzu a fermentaci kyseliny mléčné, při které se vytváří ATP nezávisle na kyslíku. Zvýšenou glykolýzou a produkcí laktátu dochází ke zpomalení buněčného cyklu, okyselení mikroprostředí nádoru a zvýšení produkce proangiogenních faktorů a složek ECM. Zvýšený příjem glukózy může také aktivovat některé onkogenní signální dráhy, které vedou ke ztrátě polarity buňky a rychlejšímu růstu. Ve srovnání s 2D kultivovanými buňky je tedy ve sféroidech vyšší produkce laktátu a zvýšená spotřeba glukózy (Nath & Devi, 2016).

3.2.5.1.4 Protinádorová léčiva

Přestože je velká snaha o vývoj nových protinádorových léčiv, až 95 % nově vyrobených cytostatik v terapii selhává. Současné 2D modely nedokážou správně napodobovat prostředí *in vivo*. Myší modely, které jsou součástí preklinických studií, sebou nesou rovněž mnoho nevýhod. Kromě ekonomické stránky sem řadíme zejména rozdílné chování oproti nádorům lidským, stromální buňky myšího původu, často nepřirozená

lokalizace nádoru a také rychlejší růst nádorů v porovnání s lidskými (Shilpa Sant & Johnston, 2017).

3D kultury nám poskytují lepší prediktivní schopnost při testování léčiv, jak již bylo zmíněné v kapitole 3.2.2.6. Je však třeba brát v úvahu fakt, že díky absenci cévního zásobení ve 3D kulturách někdy nemusí být penetrace léčiva zcela autentická jako u nádorů *in vivo*. Význam 3D modelů ve výzkumu zahrnuje také objevování nových cílů pro cytostatika. Například Michaylira et al. při 3D kultivaci buněk zjistili, že adhezní molekula periostin, která zvyšuje invazivitu nádorů jícnu, by mohla být použita jako nový terapeutický cíl (Edmondson et al., 2014, Nath & Devi, 2016).

3.2.5.1.5 Personalizovaná terapie

V poslední době se uplatňuje použití primárních kultur nádorových buněk získaných přímo od pacienta pro navrhnutí účinné a cílené terapie. Přestože tato metoda není optimalizována, několik studií prokázalo její užitečnost (Edmondson et al., 2014).

3.2.5.1.6 Vysokovýkonný screening léčiv

Nedílnou součástí objevu léčiv je HTS (z anglického „high throughput screening“) umožňující testování tisíců látek z velkých souborů označovaných jako tzv. knihovny. Výsledek takového screeningu látek nebývá přímé objevení léčiva, nýbrž látek, které mají potenciál stát se součástí budoucího léčiva. Využití 3D kultur pro tuto aplikaci však zůstává komplikované především kvůli nejednotné velikosti sféroidů a dále také materiálovým nákladům, obtížné reprodukovatelnosti, automatizaci a kompatibilitě s dostupnými metodami stanovení a detekce. Kultura visuté kapky je nejpokročilejší metodou v HTS, kdy máme k dispozici 96 a 384-jamkové závěsné destičky. Dále se využívají hydrogely, kdy však použití Matrigelu® a kolagenu není příliš populární pro jejich gelační vlastnosti při pokojové teplotě. Své uplatnění zde získávají hydrogely na bázi peptidů MAX1 a MAX8, které mají tekutý charakter a jsou tak vhodné pro manipulaci s kapalinami při HTS (Gupta et al., 2016, Labarbera et al., 2012, Langhans, 2018).

3.2.5.2 Regenerativní medicína a tkáňové inženýrství

Regenerativní medicína se zabývá nahrazováním tkání a orgánů, které jsou poškozené věkem, onemocněním či traumatem a také napomáhá zlepšování vrozených vad. Součástí regenerativní medicíny je také tkáňové inženýrství, jehož cílem je sestavování funkčních konstruktů, které mají schopnost obnovovat, udržovat či zlepšovat poškozené tkáně nebo celé orgány (Mao & Mooney, 2015, National institute of health, 2019).

Sféroidy se v tkáňovém inženýrství uplatňují pro tvorbu komplexních tkání jako jsou například chrupavka, kost, pankreatická tkáň či srdeční sval. Konstrukty bývají obvykle malého rozměru, jelikož nemají cévní síť, která by zajišťovala dostatečný přísun živin do celého implantátu. Nepřítomnost cévního systému může také zkomplikovat přijetí implantátu hostitelem. Proto je snaha vytvořit štěpy, které by byly předem vaskularizované. Model vaskularizované kostní tkáně vytvořili Bongio et al. v roce 2016. Kultivovali zde prekursorů osteoblastů a osteoklastů spolu s lidskými umbilikálními endotelovými buňkami a mezenchymálními kmenovými buňkami (MSC) z lidské kostní dřevě v hydrogelu s kolagenem a fibrinem obohaceným o nanočástice fosforečnanu vápenatého. Kromě zajištění primitivní vaskulární sítě tento model také poskytoval lepší diferenciaci osteoblastů a osteoklastů (Caddeo et al., 2017, Fennema et al., 2012).

Většina buněk používaných pro tkáňové inženýrství jsou dospělé primární buňky izolované tkáňovou biopsií. Následně dochází k jejich kultivaci pomocí nosičů, které jsou podobné přirozené tkáni. Takto připravený konstrukt je následně reimplantován pacientovi. Dospělé primární buňky však mají omezenou životaschopnost, nízkou míru proliferace a jejich izolace je složitá. Proto se často využívají kmenové buňky, především embryonální a MSC (Caddeo et al., 2017).

3.2.5.2.1 Kultivace MSC

MSC jsou progenitorové buňky, které se nacházejí v perivaskulárních prostorech všech tkání a orgánů. Jejich izolace je možná z tukové tkáně, kostní dřevě, pupečníku, plic, svalů, pokožky a také ze zubní dřevě. Tyto buňky migrují k poškozeným tkáním, regenerují je a potlačují odpověď imunitního systému na cizorodé stimuly. Dokážou přímo nahradit poškozené a odumřelé tkáně, jelikož jsou schopny diferenciaci do chondrocytů, myocytů, fibroblastů, adipocytů, astrocytů a osteocytů. Dříve byla právě tato schopnost považována za

klíčovou při jejich transplantaci, nicméně v současné době se klinické studie zaměřují na jejich vysokou parakrinní aktivitu (Caddeo et al., 2017, D'Souza et al., 2015, Petrenko et al., 2017).

MSC kultivované ve sféroidech disponují oproti MSC kultivovaných ve 2D prostředí zesílenými protizánětlivými, regeneračními/reparativními a angiogenními účinky. Další výhodou 3D kultivace je prodloužená životaschopnost MSC po jejich transplantaci. Diskutuje se také o možném posílení protinádorových účinků, protože ve sféroidech vykazují MSC zvýšenou sekreci IL24, což je multifunkční cytokin zabíjející nádorové buňky (Cesarz & Tamama, 2016).

Bylo provedeno několik experimentů na zvířatech, porovnávajících aplikaci sféroidních MSC s disociovanou suspenzí MSC. Například Liu et al. publikovali studii, při které sféroidní MSC z potkaní tukové tkáně produkovaly až 20× vyšší hladiny genů srdečních markerů ve srovnání s 2D MSC a docházelo tak k rychlejšímu zotavení po infarktu myokardu. MSC sféroidy tukové tkáně byly použité také k léčbě kožních ran u myši, kdy byla prokázána zvýšená produkce ECM proteinů jako tenascin C, kolagen VI alfa 3 a fibronektin, což vedlo ke zrychlení uzavření ran (Petrenko et al., 2017).

MSC buňky jsou také využívány podpůrně pro jiné typy buněk, například při léčbě diabetu transplantací beta buněk. Beta buňky ztrácí často svou funkčnost, pokud se kultivují ve 2D podmínkách, především díky omezené komunikaci s ECM, v jejímž důsledku může po transplantaci dojít k apoptóze. Buňky také špatně snáší nepříznivé podmínky jako jsou hypoxie či chybějící vaskularizace v místě transplantace. Při podání samostatných beta buněk je taktéž velké riziko vzniku reakce štěpu proti hostiteli či zánětlivé reakce. Výhodnou strategií se jeví společná 3D kokultivace beta buněk s MSC či kontrtransplantace. Nejvhodnější je pro tuto metodu izolovat MSC z pupeční šňůry, jelikož se zde nachází buňky velmi mladé a primitivní a mohou se tak rozlišit na shluky podobné Langerhansovým ostrůvkům, což podpoří funkčnost beta buněk (Petry et al., 2018).

3.2.5.3 Zjišťování hepatotoxicity

Léky indukované poškození jater (DILI; z angl. Drug-induced Liver Injury) je způsobené častými nežádoucími účinky léčiv. Ačkoli se jeho výskyt objevuje pouze u 4 až 19 pacientů ze 100 000, jedná se o nejčastější příčinu akutního selhání jater v USA i Evropě. Nejčastější příčinou bývá předávkování paracetamolem (Zhou et al., 2019).

Spolehlivá předpověď vzniku DILI v preklinickém hodnocení je obtížná, protože modelové systémy *in vitro* často nedokáží přesně napodobit funkčnost lidských jater. Nejprve se léčiva zkoušejí na zvířecích modelech, zde se ale uvádí, že 38 až 51 % sloučenin s hepatotoxickými účinky není odhaleno, převážně díky rozdílům v metabolických dráhách specifických pro daný druh. Proto je stále větší zájem vyvinout reálnější modelové systémy. 2D kultivace jaterních buněk se ukázala jako neefektivní, protože zde dochází ke ztrátě exprese důležitých transportérů léčiv a enzymů metabolizujících léčiva. Naopak slibné výsledky byly v poslední době získány 3D kultivací (Underhill & Khetani, 2018, Zhou et al., 2019).

3.2.5.3.1 Jaterní buněčné linie pro tvorbu sféroidů

Standardní modely pro predikci DILI využívají primární lidské hepatocyty (PHH). Zatímco čerstvě izolované PHH vykazují stejné vlastnosti jako PHH v organismu, jejich fenotyp se rychle mění v běžné 2D kultuře dediferenciací. Ve sféroidech zůstávají PHH životaschopné se stabilní sekrecí albuminu po dobu minimálně 5 týdnů. Udrží si také své metabolické a transkriptomické profily až několik týdnů, což může být užitečné pro sledování dlouhodobé toxicity při opakovaném podávání léků. Mezi jejich další výhody patří možnost kokultivace s neparenchymálními buňkami, mezi které řadíme žlučové buňky, Itovy buňky a Kupfferovy buňky a také schopnost skladovat glykogen. Oproti nádorovým jaterním buněčným liniím HepG2 (buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu), HepaRG (buněčná linie lidského cholangiokarcinomu) a 2D kultivovaným buňkám také vykazují výrazně zvýšenou aktivitu enzymů z rodiny cytochromů P450 (CYP): CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4. Oguhara et al. také prokázali schopnost PHH sféroidů odhalit hepatotoxicitu sloučenin s různými mechanismy působení jako jsou acetamonifen, chlorpromazin, diklofenak, flutamid, imipramin, tiklopidin a troglitazon v klinicky relevantních koncentracích (Bell et al., 2016, Zhou et al., 2019).

Běžně používanými nádorovými jaterními buněčnými liniemi pro studium metabolismu léčiv jsou také immortalizované HepG2, HepaRG a Huh-7 (buněčná linie odvozená od hepatokarcinomu), díky snadné dostupnosti a nízkým nákladům.

Nejvíce popsána je buněčná linie HepG2, která ve sféroidní kultuře vykazuje polarizovanou expresi transportérů spojených s mnohočetnou lékovou rezistencí MRP2 (Multidrug Resistance-associated Protein 2) a MDR1 (MultiDrug Resistance protein 1),

zlepšenou sekreci albuminu ve srovnání s 2D kulturou a také zvýšenou náchylnost k toxicitě způsobené acetaminofeny. 3D kultura HepG2 také odhalila hepatotoxicitu amiodaronu, diklofenaku, metforminu, fenforminu a kyseliny valproové. Přesto tato buněčná linie stále není tak přesná v predikci hepatotoxicity jako PHH, protože vykazuje sníženou expresi a aktivitu enzymů metabolizující léčiva.

Buněčná linie HepaRG má vyšší metabolickou aktivitu než HepG2. Sféroidy lze kultivovat až 7 týdnů s polarizovanými transportéry a strukturami žlučových cest. Bylo zjištěno, že ve sféroidech aktivity enzymů CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 a UGT (uridin 5'-difosfoglukuronosyltransferasa) zůstaly stabilní a jejich hladina byla až 20× vyšší než u 2D struktur. HepaRG sféroidy vykazovaly také větší citlivost na acetaminofenon a aflatoxin B1.

Sféroidy z kmenových buněk odvozených od hepatocytů se získávají diferenciací lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Jejich použití pro jaterní 3D sféroidní modely je možnou alternativou pro zjištění hepatotoxicity léků. Využití nachází především při vyhledávání interindividuálních rozdílů. Buňky jsou získány přímo od pacientů, kteří v minulosti trpěli neobvyklými reakcemi na léky (Zhou et al., 2019).

3.2.5.3.2 Způsoby vytváření jaterních sféroidů

Jaterní sféroidy jsou často vytvářeny pomocí bioreaktorů, kde vytvářejí funkční síť žlučových kanálků, exprimují markery specifické pro hepatocyty a vykazují trvalou aktivitu CYP. Představují tak vynikající kultivační systém pro dlouhodobou kultivaci. V roce 1994 Gerlachem s jeho kolegy vyvinuli bioreaktor tvaru válce, kde se kromě kultivovaných buněk uvnitř nachází i dutá vlákna, která napodobují síť kapilár, čímž je umožněna perfuze média a plynů. Jaterní buňky se pak kultivují mimo tento kapilární prostor, a jsou tak chráněny před přímým tokem média.

Bhatia s jeho kolegy vytvořili alternativní systém, kde se jaterní buňky naočkují na mikropatternové ECM ostrovy, které jsou obklopeny podpůrnými myšími fibroblasty. PHH v této kokultuře pak vytváří síť žlučových kanálků a udržují expresi enzymů 1. a 2. fáze, podílející se na metabolismu léčiv a expresi jaderných receptorů a transportérů léčiv po dobu nejméně 6 týdnů. Mikropatternové kokultury jsou aktuálně vysoce využívané jako cenné modely pro studium různých fází vývoje léčiv (předpověď clearance léčiv, lékových interakcí, profilování metabolitů léčiv, DILI), protože velmi napodobují složitost lidských jater. Další

z možností je využití vícejamkových ULA destiček či kultivace buněk pomocí nosiče. Využívané jsou také mikrofluidní techniky (Zhou et al., 2019).

3.3 Fotodynamická terapie (PDT)

PDT je léčebná metoda pro různé druhy nádorů a některá nezhoubná onemocnění, známá pro svou minimální invazivitu. Kromě nádorových onemocnění je využívána také k léčbě degenerativních stavů souvisejících s věkem jako je ateroskleróza. Ve srovnání s běžnými protinádorovými terapiemi (chemoterapie, radioterapie), má PDT méně vedlejších účinků. Lze ji také aplikovat u pacientů s neoperovatelnými nádory.

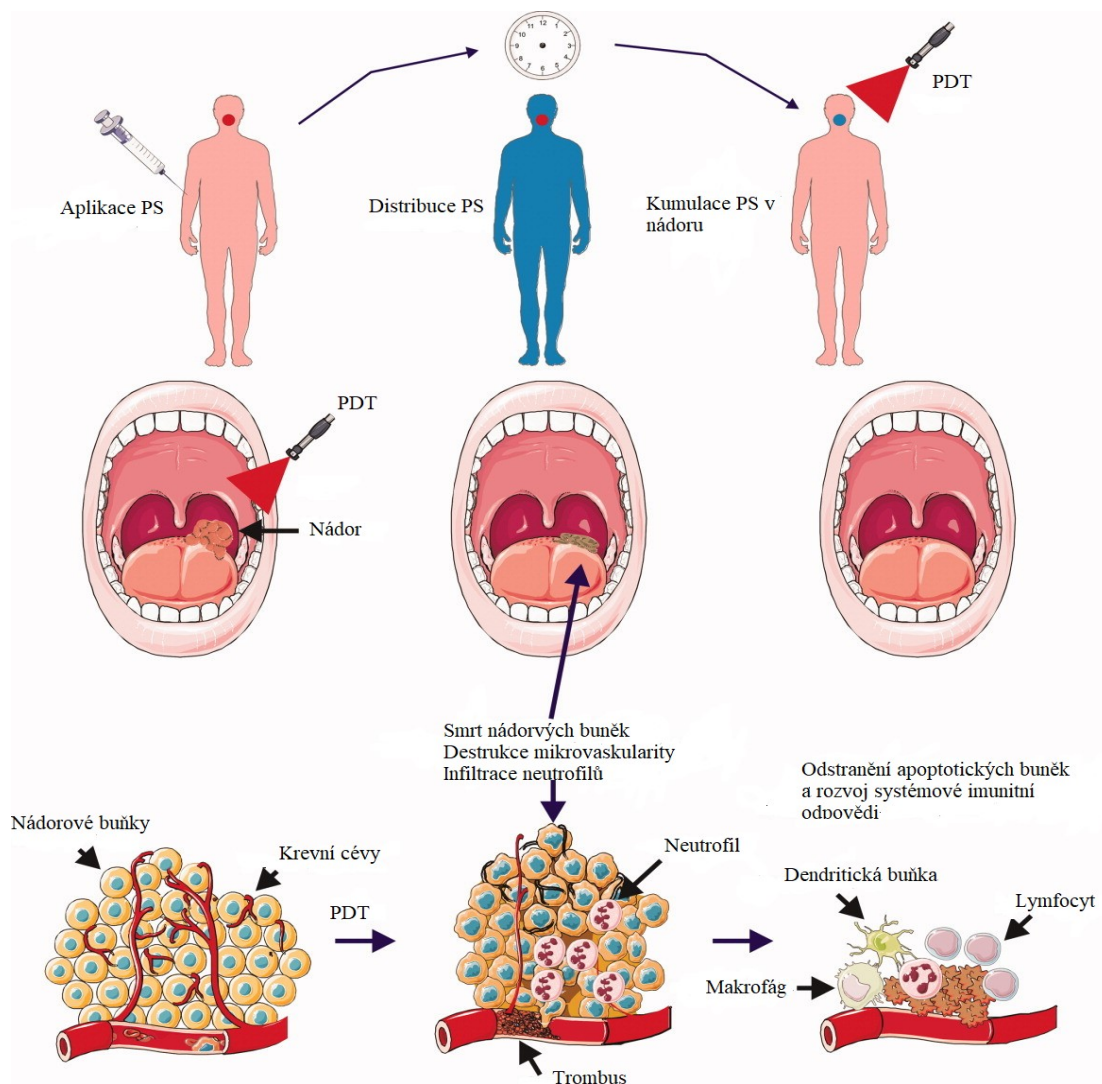
Metoda spočívá v podání PS, který se následně ozáří světlem o vlnové délce odpovídající absorpčnímu pásmu daného PS. To má za následek vznik ROS, které poškozují nádorové buňky (Mohammad-Haidi et al., 2018).

3.3.1 Princip PDT

PS, světlo a kyslík vytváří tři základní složky PDT. PS se do těla pacienta podá lokálně nebo systémově do krevní cirkulace. Po jeho distribuci se PS hromadí v nádorové tkáni a po ozáření dochází k jeho aktivaci fotochemickou reakcí (Obr. 13), při které vzniká z molekulárního kyslíku ($^3\text{O}_2$) kyslík singletový ($^1\text{O}_2$). Ten působí toxicky na buňky a způsobuje buněčnou smrt apoptózou, nekrózou či autofagií se současným navozením lokální zánětlivé reakce, která se podílí na odstraňování odumřelých buněk a obnovení normální tkáňové homeostázy či může vést k rozvoji systémové imunity. Povaha buněčné smrti závisí především na místě, kde působí PS. Pokud se hromadí v mitochondriích, dochází často k apoptóze, naopak jestliže se kumuluje v plazmatické membráně, po ozáření následuje obvykle nekróza. Autofagie bývá zprostředkována PS hromadící se v lyzosomech či endoplazmatickém retikulu. Nicméně i apoptóza nakonec přestupuje v nekrózu, jelikož dochází k nadměrnému poškození buněk a rychlé lýze (Kwiatkowskiet al., 2018).

Protinádorové účinky jsou tedy zajištěny třemi mechanismy, mezi které patří již výše zmíněné přímé cytotoxické účinky, indukce zánětlivé reakce a dále dochází k poškození vaskularity nádoru. K poškození krevních cév nádoru dochází prostřednictvím agregace destiček, která vede k hypoxii nádorové tkáně a buněčné smrti. Do jaké míry bude jednotlivý

mechanismus zastoupen, závisí na použité dávce PS, době mezi podáním a expozicí světla, celkové dávce světla, intenzitě světla, koncentraci kyslíku a dalších méně známých faktorů.



Obrázek 13. Princip PDT. Upraveno z (Agostinis et al., 2011).

PS mají za normálních podmínek stabilní singletový stav. Po ozáření a absorpci světla dojde k přechodu elektronu na vyšší energetickou hladinu za vzniku tzv. excitovaného stavu. Tento stav je však nestabilní, proto se PS vrací do svého stabilního stavu, při kterém se musí zbavit nadbytečné energie. K tomu dochází vyzářením energie ve formě fluorescence nebo tepla. Další z možností, jak se excitovaný PS může zbavit energie je mezisystémový přechod za vzniku stabilnějšího tripletového stavu.

PS v tripletovém stavu může generovat ROS mechanismem typu I nebo II. Mechanismus II. typu je jednodušší, častější a dochází zde k vytvoření $^1\text{O}_2$ předáním nadbytečné energie tripletového stavu na $^3\text{O}_2$. Občas se může vyskytnout mechanismus typu I,

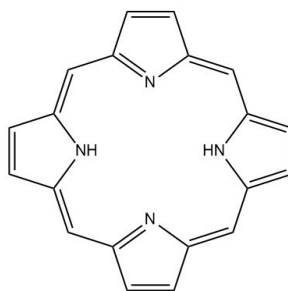
kdy PS reaguje přímo se substrátem v buněčném mikroprostředí například s buněčnou membránou a prostřednictvím přenosu protonu nebo elektronu vzniká radikálový kationt či aniont. Tyto radikály pak mohou reagovat s kyslíkem za vzniku ROS. Mechanismy typu I a II mohou také probíhat současně, poměr pak závisí na typu použitého PS, koncentraci substrátu a množství kyslíku nacházejícím se v buňce (Agostinis et al., 2011).

3.3.2 Fotosenzitizér (PS)

Předpoklady pro ideální PS jsou vysoká chemická čistota a selektivita pro nádorové buňky, přičemž by mělo dojít k jeho eliminaci ze zdravých tkání co nejrychleji. Dalšími požadavky jsou krátký časový interval mezi podáním a maximální akumulací v nádorové tkáni, minimální cytotoxicita ve tmě a snadná rozpustnost v tělních tekutinách.

Absorbance PS by měla být vysoká v rozmezí mezi 600 až 800 nm, protože absorpce fotonů s vlnovými délkami delšími než 800 nm neposkytuje dostatek energie pro excitaci $^3\text{O}_2$ do $^1\text{O}_2$. Jeho absorpční minimum by mělo být v rozsahu od 400 nm do 600 nm, čímž se redukuje fotocitlivost způsobená slunečním zářením. Jelikož pronikání světla do tkáně roste se zvětšující se vlnovou délkou, PS absorbující při větších vlnových délkách jsou účinnější (Kwiatkowski et al., 2018).

Převážná část PS má strukturu odvozenou od porfyrinů (Obr.14), které se skládají z tetrapyrrolového aromatického jádra. Porfyriny se vyskytují přirozeně například v hemu, chlorofylu či bakteriochlorofylu. Nejpoužívanější deriváty porfyrinů v PDT jsou chloriny a Pc. Druhou skupinou jsou neporfyrinové PS, mezi něž řadíme kyselinu 5-aminolevulinovou (ALA), fenotiaziny, xantiny, triarylmethany, hypericin a kurkumin. (Castano et al., 2004, Oniszczyk et al., 2016)



Obrázek 14. Porfyrin.

3.3.2.1 Dělení PS

PS rozlišujeme na první, druhé a třetí generace. Mezi PS první generace řadíme hematoporfyrinový derivát (HpD) a jeho analogy. Nejvyužívanějším zástupcem této skupiny je porfimer sodný (komerčně známý jako Photofrin®). Jedná se o čištěnou směs HpD dimerů a oligomerů. Přestože tyto látky vykazují dobrou tumoricidní odpověď, jejich využití v současné době zůstává převážně jen pro léčbu nádorů plic a jícnu. Nevýhodou porfimeru sodného je totiž jeho slabá absorpce kolem 630 nm a také retence kůže, která vede k dlouhodobé fotosenzitivitě (Kwiatkowski et al., 2018, Zhang et al., 2018).

Řešení přinesly PS druhé generace, které jsou chemicky čisté, absorbují při vyšších vlnových délkách, poskytují vyšší výtěžek $^1\text{O}_2$ a nižší fotosenzitivitu kůže. Mezi nejznámější PS druhé generace patří chlorinový PS temoporfin (*m*-tetrahydroxyfenylchlorin, *m*-THPC) a ALA, která je využívána hlavně v dermatologii. ALA a její deriváty lze podat orálně či topicky a jsou označovány jako tzv. proléčiva, protože je nutná jejich aktivace v těle převedením na protoporfyrin IX. Nevýhodou PS druhé generace je však jejich špatná rozpustnost ve vodě, která omezuje možnost intravenózní podání.

Existují také PS třetí generace. Přestože přetrvává problém s obtížnou rozpustností ve vodě, tyto PS disponují vysokou afinitou k nádorové tkáni, čímž se minimalizuje poškození okolních zdravých buněk. Vysoká afinita je zajištěna několika modifikacemi, mezi které patří například spojení PS s LDL lipoproteinem, jelikož nádorové buňky při svém růstu spotřebovávají velké množství cholesterolu. Dále je možné konjugovat PS s monoklonální protilátkou proti specifickému antigenu na povrchu nádorové buňky nebo využít povrchových markerů nádoru, mezi které řadíme receptory pro růstový faktor, transferin či různé hormony (Kwiatkowski et al., 2018).

3.3.3 Světelné zdroje

Nejefektivnější je využití světla s vlnovou délkou 600 až 800 nm, které odpovídá červené, ale zasahuje také do infračervené oblasti spektra. Pro PDT se využívají lasery nebo výbojky s podobnou účinností. Alternativním zdrojem mohou být světlo emitující diody (LED). Žádný jediný zdroj světla však není vhodný pro všechny aplikace PDT. Výběr je závislý na nemoci (lokalizace, velikost nádoru, přístupnost, charakteristika tkáně), výběru PS a také ceně (Agostinis et al., 2011).

3.4 Využití 3D kultur ve výzkumu PDT

3D modely se v PDT využívají díky jejich lepším vlastnostem pro sledování vychytávání PS buňkami a predikci účinnosti terapie. Solidní nádory vytváří v těle různé gradienty kyslíku, stejně tomu tak je i v 3D modelech. Vzhledem k tomu, že je PDT závislá na dodávce kyslíku, poskytují 3D modely optimálnější podmínky pro testování než 2D kultury.

Chen et al. v roce 2015 zveřejnili studii, ve které použili buňky T47D odvozené z lidského karcinomu prsu. Buňky byly kultivovány s methylenovou modří jako PS ve 2D i ve 3D prostředí. Buňky kultivované v monovrstvě poskytovaly daleko lepší odpověď na PDT v porovnání se sféroidy. Velikost sféroidů byla také výrazným parametrem ovlivňujícím účinnost terapie. Větší sféroidy byly odolnější vůči PDT, díky horší penetraci PS a také nízké koncentraci kyslíku uvnitř sféroidu (Mohammad-Haidi et al., 2018).

3.4.1 Nanoterapie

Převážná část PS je hydrofobní a ve vodném prostředí pak dochází k jejich agregaci. Agregace znemožňuje fotoaktivitu PS a PDT tudíž ztrácí svou účinnost. Tato skutečnost také zabraňuje podání PS intravenózně. Spojením PS s hydrofilními nosičovými systémy (často je používán termín nanočástice i přes to, že některé z nich se pohybují svou velikostí až v řádu mikrometrů) udržuje PS v monomerním stavu a zabraňuje tak jejich předčasné degradaci. Nanočástice jsou navíc specificky zaměřeny na nadměrně exprimované receptory nebo antigeny na povrchu nádorových buněk a tím dochází ke zlepšení biologické dostupnosti PS.

Nanočástice mohou být organické látky (různé polymery jako je PEG), anorganické látky (zlato, křemík), liposomy a micely. Vzhledem k jejich malé velikosti se nanočástice dostávají do buňky prostřednictvím endocytózy a následně dochází k jejich kumulaci uvnitř organel endolyzozomálního kompartmentu. Po ozáření dochází ke vzniku ROS uvnitř endosomů a/nebo lyzozomů. Po dostatečné dávce záření dojde k prasknutí membrány a uvolnění ROS a nanočástic z lyzozomů do cytosolu (Agostinis a kol., 2011, Kwiatkowski et al., 2018).

Bylo provedeno několik studií zaměřujících se na využití nanočástic ve studiu účinnosti na 3D kulturách. Primární výhodou využití těchto kultur v PDT s nanočásticemi spočívá ve schopnosti zahrnout problém s jejich průnikem do buněk nacházející se uvnitř

nádoru, který není zohledněn ve 2D kulturách. Z výsledků těchto studií se zdá být využití nanočástic v PDT výrazně účinnější, než je tomu při podání samostatného PS.

Například v roce 2015 publikovali Yang et al. studii, ve které porovnávali účinnost ALA v komplexu s nanočásticemi zlata s jeho volnou formou a také ovlivnění výsledku v závislosti na použití 2D či 3D buněčného modelu. Pro studii byl použit model vytvořený z lidských buněk prsního karcinomu (MCF-7) a primárních stromálních buněk odvozených od tukové tkáně (ASC). Po čtyřech hodinách kultivace s 1 mM koncentrací PS rozpuštěném v médiu bez séra bylo zjištěno, že při podání samostatného PS došlo ve 2D kultuře k usmrcení cca 50 % buněk a ve 3D kultuře pouze k 17 % buněk. Při podání PS konjugovaného s nanočásticemi zlata se účinnost zvýšila na 70 % u 2D kultury a 50 % u 3D kultury. Při delším ozařování byly téměř všechny buňky kultivované v monovrstvě zničeny, bez závislosti na využití nanočástic. 3D kultura přesto vykazovala velký rozdíl v životaschopnosti buněk. Buňky ošetřené samostatným PS zde vykazovaly 50% destrukci, naopak při použití konjugovaného PS až 90%. V této studii byla také pozorována rozdílná distribuce obou PS ve 3D modelu. Zatímco při použití volného PS byly mrtvé buňky lokalizovány především v povrchových vrstvách nádorové tkáně, komplex nanočástic s PS byl schopný proniknout skrz matici hlouběji do tkáně a mrtvé buňky se nacházely ve všech vrstvách (Mohammad-Haidi et al., 2018).

4 CÍLE PRÁCE

- Tvorba sféroidů pomocí metod visuté kapky a ULA destiček. Stanovení optimální počáteční koncentrace buněk a výběr vhodnější metody zhotovení sféroidů pro naše účely.
- Srovnání rychlosti růstu sféroidů a jejich uniformity u obou metod.
- Použití kolagenu při zhotovení sféroidů pomocí visuté kapky za účelem dosažení kompaktnější struktury.
- Zjišťování vlivu výměny média během kultivace na průměr sféroidů vytvořených ULA destičkou.
- Optimalizování času inkubace sféroidů s činidlem AlamarBlue™ pro vyhodnocování cytotoxicitních testů. Srovnání citlivosti a vhodnosti AlamarBlue™, AlamarBlue™ HS a PrestoBlue™.
- Stanovení fotodynamické aktivity u nově syntetizovaných amfifilních (aza)ftalocyaninových PSs P40 a P44 na sféroidech tvořených buněčnou linií HeLa. Porovnání efektivity využití xenonové lampy vs. laserové diody.
- Optimalizování postupu barvení pro zobrazení sféroidů konfokální mikroskopií.
- Provedení testů invaze a migrace se sféroidy tvořenými buněčnou linií HeLa.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Laboratorní vybavení pro práci s buněčnou linií

5.1.1 Pracovní pomůcky

- 24-jamkové mikrotitrační destičky, ploché dno (TPP, Švýcarsko)
- 96-jamková mikrodestička Nunclon™ Sphera™, kulaté dno (ThermoFisher Scientific, Japonsko)
- 96-jamkové mikrotitrační destičky, ploché dno (TPP, Švýcarsko)
- automatické pipety, různý rozsah (Eppendorf, Německo)
- Bürkerova komůrka (Brand, Německo)
- Pasteurovy pipety, sterilní (Brand, Německo)
- podložní sklíčko s opakovatelně použitelnou zobrazovací komůrkou (ThermoFisher Scientific, USA)
- sterilní inkubační nádoby T75, plastové (TPP, Švýcarsko)
- sterilní laboratorní sklo (Simax, Česká Republika)
- sterilní mikrozkuřavky, různý objem (Eppendorf, Německo)
- sterilní pipety, plastové, různý objem (TPP, Švýcarsko)
- sterilní plastové vaničky (Eppendorf, Německo)
- sterilní stříkačkový filtr s póry 0,2 μm, průměr 13 mm (Fisher Scientific, Česká Republika)
- sterilní stříkačkové filtry s póry 0,22 a 0,45 μm, průměr 33 mm (TPP, Švýcarsko)
- sterilní špičky, plastové, různý rozsah (Eppendorf, Německo)

5.1.2 Pracovní přístroje

- 450 W xenonová lampa Newport s vodním high-pass filtrem OG570 (Newport Corporation, USA)
- buněčné inkubátory s termostatem a regulací koncentrace CO₂ (Sanyo, Japonsko a Esco, USA)
- centrifuga Hermle Z 300 (Hermle Labor Technik, Německo)
- čtečka mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Švýcarsko)
- desková třepačka Heidolph Titramax 100 (Heidolph Instruments, Německo)
- konfokální laserový rastrovací mikroskopický systém Nikon A1+ (Nikon, Japonsko)
- sestava na ozařování vzorku fokusovatelným laserovým svazkem $\lambda = 685 \text{ nm}$
 - řídicí jednotka laserů s kontrolou teploty ThorLabs ITC4020 (Thorlabs, USA)
 - diodový laser s pracující v kontinuálním režimu s vlnovou délkou 685 nm, nominálním optickým výkonem $>3 \text{ W}$ a termočlánkem pro zpětnovazebnou kontrolu teploty a chlazení Coherent #48274 (Coherent, USA)
 - vysokovýkonné optické vlákno pro vyvázání laserového svazku (550 μm jádro, N.A. 0,22) ThorLabs TP02081127 (Thorlabs, USA)
 - zoomovací optika ThorLabs SM1NR05 s adaptérem S120-SMA (ThorLabs, USA)
- zařízení pro měření optického výkonu laserů Coherent FieldMate #1098297 s čidlem PowerMax PM10 #1097901 (Coherent, USA) s laminárním prouděním Bio Air TopSafe 1.2 (EuroClone, Itálie)
- vodní lázeň (Memmert, Německo)

5.1.3 Použité chemické látky a reagensie

- AlamarBlue™ (ThermoFisher scientific, USA)
- AlamarBlue™ HS (ThermoFisher scientific, USA)
- fetální bovinní sérum (Sigma-Aldrich, Belgie)
- fluorescenční sonda Actin Green (Molecular Probes, USA)
- fluorescenční sonda Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA)
- PBS, tablety (Sigma-Aldrich, Německo)
- fotosensitizer P40 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- fotosensitizer P44 (vědecká skupina prof. Zimčíka, FaF UK)
- Geltrex® (ThermoFisher scientific, USA)
- kultivační médium DMEM (Lonza, Belgie)
- paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- PrestoBlue™ (ThermoFisher scientific, USA)
- projasňující reagensie – CytoVista 3D Cell Culture Clearing Reagent (ThermoFisher scientific, USA)
- pufr HEPES, 1M (Sigma-Aldrich, Německo)
- penicilin/streptomycin (Lonza, Belgie)
- roztok peroxidu vodíku, 3% (Fluka, Německo)
- roztok trypsin/EDTA (Lonza, Belgie)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Německo)
- trypanová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- ultraglutamin I (Lonza, Belgie)

5.2 Buněčná linie HeLa

Buněčná linie HeLa je nejstarší lidskou buněčnou linií používanou v biologických výzkumech. Byla získána v roce 1951 z buněk rakoviny děložního čípku Henrietty Lacksové, podle které je také pojmenována. Patří k nejpoužívanější buněčné linii, především pro její odolnost a rychlou proliferaci (Brendan et al., 2009).

5.2.1 Kultivační médium

Pro přípravu kultivačního média SCM (DMEM médium obsahující sérum) bylo nejprve nutné některé potřebné roztoky (vyjma Hepes pufru a Ultraglutaminu) rozeřít v lázni na teplotu 37 °C. Poté jsme přešli k samotné přípravě kultivačního média, která probíhala v laminárním boxu za sterilních podmínek.

K DMEM médiu o celkovém objemu 500 ml jsme přidali 50 ml fetálního bovinního séra, 5 ml 1 M Hepes pufru, 5 ml roztoku penicilinu/streptomycinu (zásobní roztok obsahuje 10 000 U penicillinu a 10 mg/ml streptomycinu) a 10 ml 200 mM Ultraglutaminu I. Výsledné SCM médium bylo uchováváno v lednici a před použitím vždy vytemperováno na 37 °C ve vodní lázni.

5.2.2 Pasážování buněk

Pro udržení životaschopnosti buněk je nutné jejich pravidelné pasážování. Proces pasážování buněk spočívá v přenosu části buněk z původní kultivační lahve do nové, která obsahuje čerstvé médium dodávající buňkám živiny. Jako kultivační lahve byly pro HeLa buňky použity plastové lahve T75.

Před každým zahájením pasážování bylo nutné nejprve mikroskopicky zkontrolovat dno kultivační lahve, které by mělo být téměř pokryto buňkami. Mikroskopicky byla potřeba také zhodnotit morfologie buněk a zda nedošlo k případné kontaminaci buněčné kultury. Pasážování buněk probíhalo v laminárním boxu za sterilních podmínek s předem předeřtými roztoky.

Po kontrole byly buňky nejprve opláchnuty PBS (2 × 5 ml). Tento krok je důležitý, jelikož sérum z média obsahuje látky inaktivující trypsin. Po odsátí veškerého PBS byl pro oddělení buněk ode dna kultivační lahve použit roztok trypsinu (1 ml). Uzavřenou lahev s

trypsinem jsme umístili do inkubátoru, kde jsme ji nechali inkubovat maximálně 5 minut při 37 °C.

Během inkubační doby jsme lahev kontrolovali pod mikroskopem, abychom si ověřili, že došlo k oddělení všech buněk ode dna lahve. K buňkám bylo následně přidáno 9 ml SCM média a několikanásobným nasátím a vysátím obsahu lahve bylo zajištěno dostatečné promíchání buněk a případné resuspendování jejich shluků. Část suspenze byla následně pipetována do nové sterilní kultivační lahve, která obsahovala 15 ml čerstvého předeřátého SCM. Zbytek buněk ve staré kultivační lahvi jsme použili pro experimenty. Buňky v nové lahvi jsme důkladně promíchali s SCM opětovným nasátím a vysátím obsahu lahve pro vytvoření homogenní buněčné suspenze. Uzavřenou lahev jsme v její vodorovné poloze opatrným pohybem promíchali tak, aby se buněčná suspenze nedostala do hrdla lahve a následně ji uložili do inkubátoru kultivovat.

Kultivace probíhala při 37 °C, 5 % CO₂ a konstantní vlhkosti 3-4 dny. Poté bylo nutné provést další pasážování buněk.

5.2.3 Stanovení počtu životaschopných buněk

Počet živých buněk byl zjišťován pomocí Bürkerovy komůrky a 0,4% trypanové modři. Trypanová modř je barvivo schopné volně prostupovat do buňky skrze plazmatickou membránu. Živé buňky trypanovou modř aktivně transportují z buňky, proto zůstávají neobarvené. Naopak mrtvé buňky tuto schopnost nemají, tudíž dochází ke hromadění barviva uvnitř buněk, které pod mikroskopem vidíme jako modré.

Při pasážování buněk byl odebrán vzorek buněčné suspenze, který byl smíchán s předem nachystanou trypanovou modří v mikrozkuhavce v poměru 1:1. Po důkladném promíchání obsahu mikrozkuhavky bylo pipetováno 10 µl barviva s buněčnou suspenzí do každé poloviny Bürkerovy komůrky. V každé polovině Bürkerovy komůrky byl spočítán počet živých buněk v pěti čtvercích s využitím objektivu 10×. Z výsledného počtu živých buněk jsme přepočtem zjistili množství životaschopných buněk v 1 ml suspenze.

5.3 Tvorba 3D sféroidů

Pro tvorbu sféroidů jsme použili dvě metody, a to metodu visuté kapky a ULA destiček.

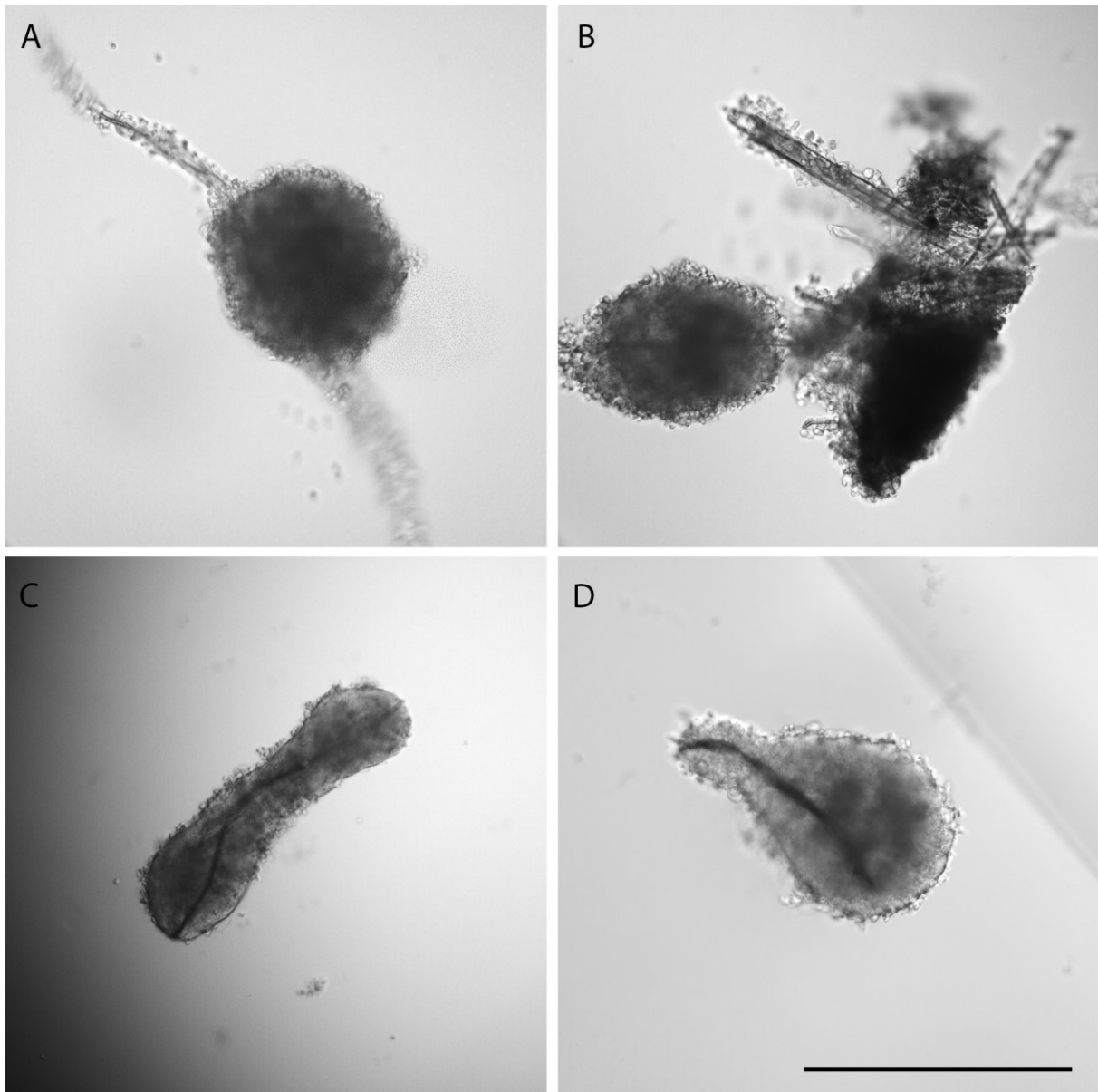
5.3.1 Vytvoření buněčné suspenze pro nasazení buněk

Buněčná suspenze byla získána naředěním původní suspenze odebrané z kultivační lahve při pasážování. Ředění bylo provedeno pomocí předeřátého SCM, přičemž jeho přidané množství bylo zjištěno výpočtem. Ten zohledňoval počet životaschopných buněk v suspenzi, požadovanou koncentraci buněk a výsledný potřebný objem suspenze.

Veškeré roztoky pro oplachování a ředění je vhodné filtrovat filtrem s velikostí pórů 22 μm či menších pro minimalizaci přítomnosti případných pevných částic, které mohou narušit tvorbu sféroidů. Vzhledem k přítomnosti mikroskopických částic prachu i ve sterilním laboratorním skle však není možné dosáhnout kompletního odstranění všech nežádoucích částic v běžném laboratorním provozu. Odstranění tohoto problému by bylo možné pouze v bezprašných laboratořích.

Filtrace roztoků před použitím však tento problém značně minimalizuje. V případě, že ve vzorku spolu s buňkami nějaká nečistota je, tak vytváří jediný dostupný adhezí povrch, ke kterému buňky přilnou a sféroid se začne tvořit kolem této částice. To může vést k tvorbě pravidelného sféroidu např. na celulózovém vlákně buničiny (Obr. 15 A). Častěji se však tvoří nepravidelné (Obr. 15 B a D) či válcovité (Obr. 15 C) útvary obklopující celou částici/částice.

V případě přítomnosti nepravidelných sféroidů vytvořených kolem částic nečistot je nutné jejich vyloučení z experimentů. U sféroidů výrazně se lišících od kulovitého tvaru dochází k výraznému rozdílu v odpovědi buněk na experimentální podmínky. To je dáno tím, že v kulovitém sféroidu jsou buňky vždy pravidelně a stejně vzdálené od povrchu, protože průměr sféroidu je ve všech místech přibližně stejný. U nepravidelného tvaru dochází ke změně vzdálenosti buněk v různých místech sféroidu od povrchu, a změně celkové odpovědi na podněty z vnějšku a celkové životaschopnosti této masy buněk (válcovitý útvar má vyšší životaschopnost než kulovitý), což by vnášelo další chybu do případného experimentu (Zanoni et al., 2016).



Obrázek 15. Pevné částice zabudované do sféroidů. Měřítko odpovídá 700 μm .

5.3.2 Metoda visuté kapky

Pro vytvoření kapky jsme zvolili objem 40 μl (maximální možný objem pro vytvoření kapky v našem experimentálním uspořádání). Rozhodli jsme se vytvořit kapky se čtyřmi různými koncentracemi buněk: 3000, 1000, 250 a 50 buněk/kapku.

Připravili jsme si buněčnou suspenzi s koncentrací 75 000 buněk/ml, která odpovídala koncentraci 3000 buněk/40 μl . Z této suspenze jsme následně připravili do sterilních mikrozkušavek další námi požadované koncentrace. Ředění bylo opět provedeno pomocí předeřátého SCM.

Buněčné suspenze daných koncentrací byly pipetovány automatickou pipetou na vnitřní stranu víka 24-jamkových mikrotitračních destiček. Každá jamka obsahovala pouze jednu kapku. Vždy bylo vytvořeno více kapek dané koncentrace, aby se zajistil dostatečný počet opakování. Byly využity pouze jamky nacházející se ve středu jamek destičky. Víko bylo poté opatrně překlopeno na mikrotitrační destičku. Do všech jamek destičky bylo předem napipetováno 500 μ l PBS pro zabránění vysychání kapek.

Obdobně lze vytvářet visuté kapky i na sterilních Petriho miskách – zde je ale potřeba nechávat dostatečný rozestup mezi jednotlivými kapkami. Více zde však hrozí, že při neopatrné manipulaci a při převrácení víka může dojít ke slítí sousedních kapek k sobě.

Celý proces přípravy visuté kapky probíhal za sterilních podmínek v laminárním boxu. Destičky s kapkami se uchovávaly v inkubátoru při 37 °C. U visutých kapek je také dobré uchovávat kultury celou dobu v nejnižším patře inkubátoru u země, kde jsou nejmenší vibrace způsobené otevíráním a zavíráním dveří inkubátoru.

5.3.2.1 Využití kolagenu ve tvorbě sféroidů

Proteiny extracelulární matrix by měly napomoci tvorbě kompaktnějších sféroidů (Kuo et al. 2017), proto jsme médium suplementovali kolagenem získaným z potkaních ocásků. Vytvořili jsme kapky o koncentraci 500 buněk/kapku v 24-jamkové mikrotitrační destičce. SCM bylo obohaceno o kolagen ve finálních koncentracích 0,01 %, 0,005 %, 0,001 % a 0,0005 %. Jako kontroly byly použity kapky s čistým SCM. Pro kapky jsme použili pouze středové jamky a každou koncentraci jsme opakovali 4 \times . V krajních jamkách totiž dochází k většímu odparu a odlišné výměně plynů než v jamkách ve středu destičky.

5.3.3 Využití ULA destiček

Buněčné suspenze pro tuto metodu byly vytvořeny v koncentracích 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku.

Do 96-jamkové ULA destičky bylo automatickou pipetou napipetováno 200 μ l buněčné suspenze. Následně jsme destičky vložili do centrifugy a stočili při 120 \times g po dobu 5 minut. Destičky jsme poté zkontrolovali pod světelným mikroskopem, kde jsme mohli po centrifugaci na dně jamek pozorovat vrstvu buněk, ze které se v průběhu následujících dnů formoval sféroid. Obrázek 16 zobrazuje sféroidy v ULA destičce vyfocené pomocí fotoaparátu formátu snímáče APS-C v kombinaci s 100 mm makro objektivem (zvětšení 1:1).

Tento obrázek ukazuje sféroid také ve svislé z-ose (na rozdíl od vodorovných os x a y při focení mikroskopem) a potvrzuje, že sféroidy mají opravdu přibližně kulatý tvar (průměry v osách x, y a z jsou přibližně stejné). Při pozorování pouze mikroskopem by nebylo poznat, zda jsou sféroid kulaté, protáhlé, či zploštělé.

Nasazení buněk opět probíhalo za aseptických podmínek a desky byly uchovávány v inkubátoru při 37 °C.

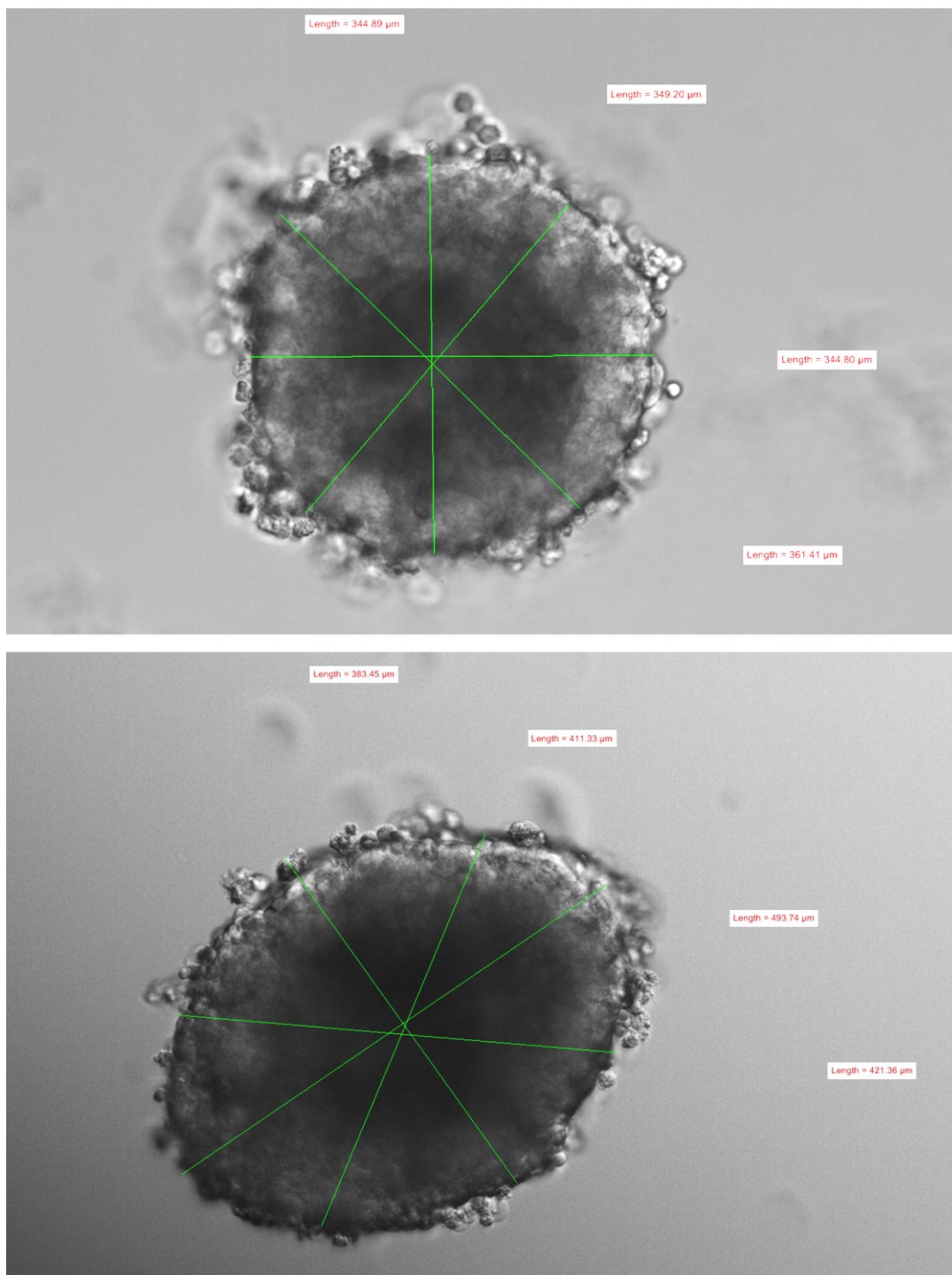


Obrázek 16. Týden staré sféroidy vytvořené v ULA destičce.

5.4 Pozorování růstu a uniformity sféroidů

Sféroidy vytvořené oběma metodami jsme pozorovali mikroskopií diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), kdy byl použit objektiv 10×. Při focení kapek bylo nutné využít další sterilní 24-jamkovou mikrotitrační destičku bez pufry, jelikož je potřeba fotit kapky tak, aby nevisely a zabránilo se tak jejich možnému sklepnutí při manipulaci a transportu. Sféroidy jsme fotili v průběhu 14 dní, přičemž jsme zaznamenávali jejich průběžný růst. Informaci o velikosti sféroidů nám poskytovalo měření jejich průměru (Obr. 17), který byl získán zprůměrováním čtyř naměřených hodnot.

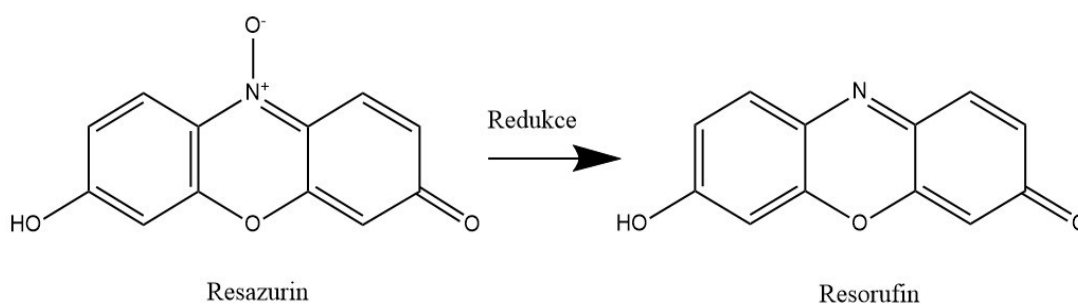
Zajímalo nás také, zda se změní výsledná velikost sféroidů, pokud vyměníme médium za čerstvé. Tento experiment byl pro snadnost výměny média proveden v ULA destičkách a byly využity sféroidy s počáteční koncentrací 500buněk/jamku. Výměna byla provedena 2. a 4. den po nasazení, vyhodnocení proběhlo 7. den.



Obrázek 17. Měření průměru sféroidů. Nahoře pravidelný tvar, kdy všechny čtyři měření ukazují podobné hodnoty. Na obrázku dole je naopak tvar protáhlý, kdy se hodnoty liší.

5.5 Testy životaschopnosti buněk

Detekce životaschopnosti buněk hraje zásadní roli při vyhodnocování cytotoxických experimentů. Pro zjištění životaschopnosti buněk sféroidů se využívají různé biochemické kalorimetrické testy, které jsou založeny na metabolické aktivitě buněk a barevné změně činidla. Jedním ze základních testů je test využívající resazurin (komerčně dostupné např. jako AlamarBlue™ (AB), popř. PrestoBlue™, UptiBlue™ apod.), který spočívá v přeměně resazurinu (oxidovaná forma) na resorufin (redukováná forma) (Obr. 18). Oxidovaná forma má barvu modrou a nevykazuje fluorescenci, zatímco redukováná forma je růžová a fluorescenční. Barvivo do buněk proniká skrze membránu pasivní difuzí a k jeho redukci dochází v cytosolu. Změnou fluorescence lze tedy prokázat počet metabolicky aktivních buněk ve sféroidu. Čím je fluorescence vyšší, tím je ve sféroidu více metabolicky aktivních a životaschopných buněk (Bonier et al., 2015).



Obrázek 18. Redukce resazurinu na resorufin.

Pro testy životaschopnosti byly připraveny sféroidy pomocí 96-jamkových mikrotitračních destiček ULA s kulatým dnem, které jsme nechali inkubovat 7 dní v inkubátoru. Dle předchozích experimentů zde byla zvolena koncentrace 500 buněk/jamku. Suspenze byla do jamek pipetována pomocí vícekanálové automatické pipety v objemu 200 μ l/jamku.

Pro měření fluorescence bylo potřeba přenést SCM médium se zredukováným AB z jamek ULA destičky do nové 96-jamkové mikrotitrační TPP destičky s plochým dnem, přičemž jsme dbali na to, aby nedošlo k narušení či nasátí sféroidů (buňky obsahují větší množství přeměněného fluorescenčního resorufinu a mohlo by docházet k falešnému zvýšení signálu). Snažili jsme se také zamezit tvorbě bublin – pipetování probíhalo reverzně. Intenzita fluorescence byla měřena pomocí čtečky mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 při $\lambda_{exc} = 530$ a $\lambda_{emi} = 590$ nm. Pro vyhodnocení životaschopnosti buněk byly naměřené hodnoty

následně zpracovány v Microsoft Office Excel. Výsledek byl vyjádřen procentuálně vztažením k neovlivněné kontrole po odečtení pozadí (signál z usmrcených sféroidů). Grafy byly zpracovány v programu GraphPad Prism 8.4.3.

5.5.1 Stanovení optimální doby inkubace AlamarBlue™ se sféroidy

Nejprve bylo naším úkolem stanovit optimální čas, který je nutný pro metabolizaci AB ve sféroidech. Kromě neovlivněných kontrol byly buňky inkubovány s peroxidem vodíku (H_2O_2) jako modelem cytotoxické látky způsobující oxidační stres. Roztoky H_2O_2 o dvojnásobné koncentraci byly připraveny v laminárním boxu do sterilních mikrozkušavek a následně byly přidány ke sféroidům v destičce výměnou za 100 μ l média (polovina celkového objemu). Výsledné koncentrace H_2O_2 byly v rozmezí 0,0015 - 0,15 %. Jako pozitivní kontrola byl použit H_2O_2 s výslednou koncentrací 0,3 %. Negativní kontrolu tvořily sféroidy, u kterých bylo pouze vyměněno 100 μ l média za čerstvé. Celkem jsme takto připravili tři destičky, které jsme nechali 24 hodin inkubovat s H_2O_2 .

Poté byl přidán AB, který byl zředěn pomocí přehřátého SCM na 20 obj. % a následně přefiltrován filtrem s póry 0,22 μ m pro odstranění krystalů, které jinak způsobují falešné zvýšení signálu, pokud jsou ve vzorku přítomny. AB byl do jamek dodán výměnou za 100 μ l média ve všech jamkách (tedy polovičního objemu, čímž jsme získali 10 \times ředění). Sféroidy byly s AB inkubovány 24 h (1. destička), 4 h (2. destička) a 2 h (3. destička). Čas, kdy byl AB ke sféroidům přidán, byl zvolen tak, aby konec inkubace a následné hodnocení probíhalo ve stejný čas pro všechny destičky.

5.5.2 Porovnání citlivost AlamarBlue™, AlamarBlue™ HS, PrestoBlue™

Porovnávali jsme také vhodnost reagensů PrestoBlue™ (PB), AB a AB HS pro vyhodnocení životaschopnosti sféroidů po působení různých koncentrací H_2O_2 . Všechna tato činidla fungují na stejném principu redukce resazurinu na resorufin. PB však umožňuje získání robustních výsledků po kratší době inkubace a s výrazně menším množstvím buněk ve vzorku (výrobce udává citlivost detekce až 10 buněk/jamku v 384j destičce), než je tomu u AB a AB HS. AB HS představuje čištěnou formu AB, která poskytuje vyšší citlivost oproti klasické AB, díky redukcí signálů způsobených přítomností kontaminace resorufiny (ThermoFisher scientific).

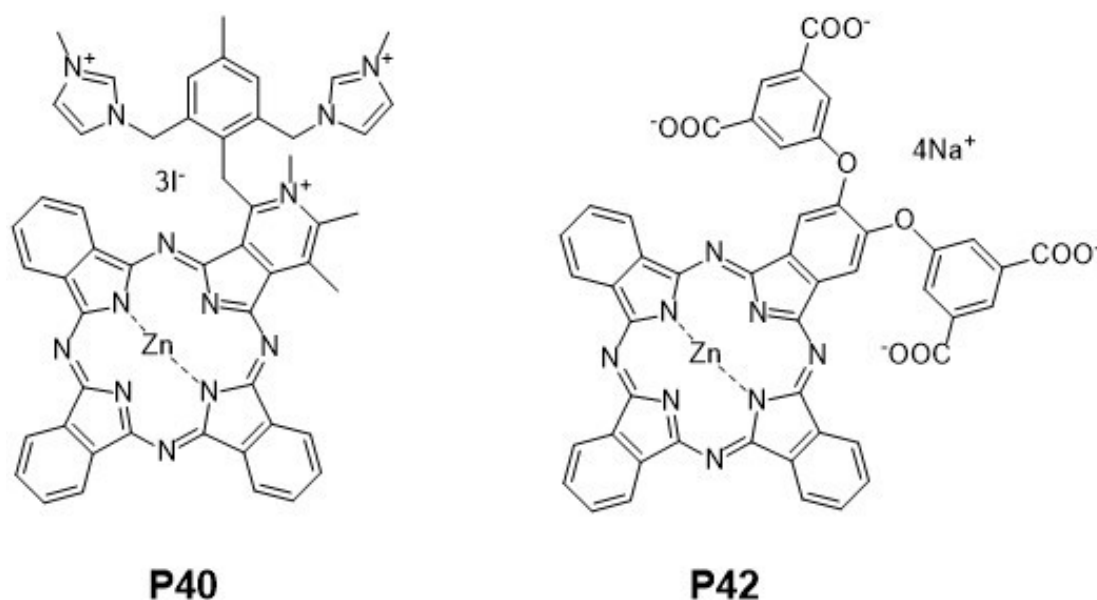
Roztoky H_2O_2 byly připraveny v laminárním boxu a ke sféroidům byly přidány opět výměnou za 100 μ l média. V pokusu byly použity výsledné koncentrace H_2O_2 v rozmezí

0,0015 – 0,3 %. Pozitivní kontrolu tvořily sféroidy ošetřené H_2O_2 s výslednou koncentrací 0,6 %. Negativní kontrolu sféroidy v čistém médiu. AB, PB i AB HS byly naředěny pomocí SCM a přefiltrovány filtrem s póry 0,22 μm . K buňkám byly přidány tak, aby výsledná koncentrace byla 10 obj. %, tedy stejně, jak bylo popsáno výše. Inkubace s reagensii probíhala 4 h.

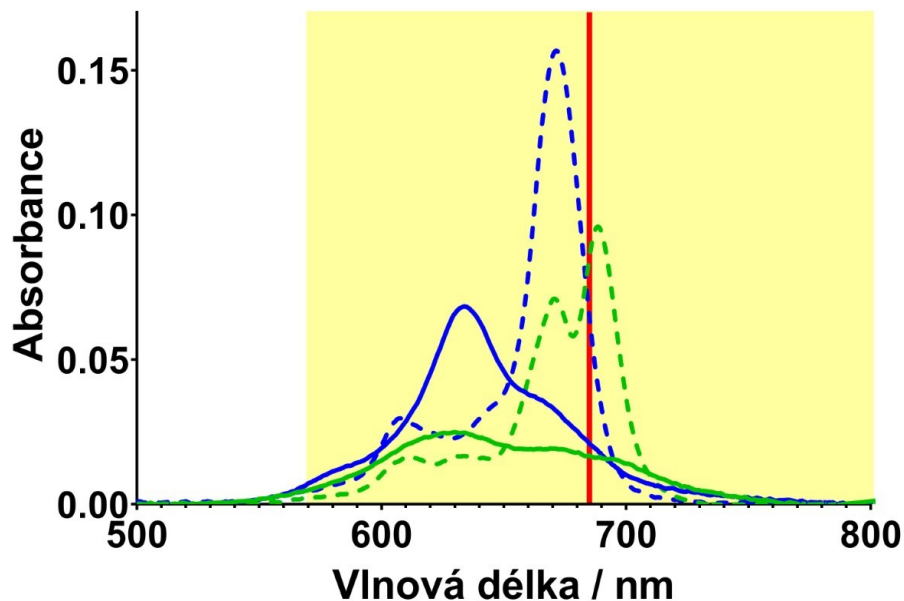
5.6 Fotototoxicita vybraných fotosensitizerů

Pro experimenty byly zvoleny PSs P40 a P44, které byly syntetizovány na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv FaF UK vědeckou skupinou prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. Látky jsou citlivé na světlo, proto byla manipulace s nimi prováděna ve tmě pro zabránění předčasné aktivace PS.

Oba studované PSs (Obr. 19) mají jako základ Pc jádro s centrálně koordinovaným atomem zinku. U sloučeniny P40 je v Pc struktuře jeden z uhlíků nahrazen dusíkem (jedná se tedy o azaftalocyanin s asymetrickým jádrem). Sloučeniny mají amfifilní charakter díky lipofilnímu Pc jádru, na které je navázán hydrofilní substituent charakteristický pro daný PS pouze na jedné čtvrtině jádra (zbylé tři čtvrtiny jádra tedy zůstávají lipofilní). Zatímco PS P40 nese trvalý kladný náboj, sloučenina P44 má náboj záporný. Absorpční spektra obou látek jsou zobrazeny na Obrázku 20 (Kollar et al., 2020).



Obrázek 19. Struktury studovaných PS



Obrázek 20. Absorpční spektra látek P40 (●) a P44 (●). Plná čára – látky rozpuštěné ve fosfátovém pufru (PBS), přerušovaná čára – látky rozpuštěné v dimethylformamidu. Graf v tomto obrázku byl vytvořen pomocí dat naměřených Mgr. Kollárem.

Všechny experimenty s PSs byly prováděny na 7 dní starých sféroidech připravených pomocí ULA destiček s kulatým dnem a s koncentrací 500 buněk/jamku – jejich průměr je v 7. dni $440 \pm 11 \mu\text{m}$.

5.6.1 Využití Xe výbojky jako zdroje záření

Pro tyto experimenty byly použity PSs P40 a P44 ve finálních koncentracích od 0,05 – 5 μM . PSs byly k buňkám přidány výměnou 100 μl média za médium obsahující PS o dvojnásobné koncentraci, než je koncentrace finální. Jako pozitivní kontrola byl zvolen opět 10% H_2O_2 . Jako negativní kontrola pak sféroidy, u kterých došlo pouze k výměně 100 μl média za médium čerstvé. Inkubace s PSs probíhala přes noc (12 h).

Následující den jsme sféroidy dvakrát opláchli čistým médiem, abychom odstranili veškeré nenavázané PSs (kromě sferooidů ošetřených H_2O_2 , protože došlo k jejich dezintegraci a hrozilo by tak odsátí – u těch bylo pouze opatrně vyměněno 100 μl média). Destičky jsme ozařovali 30 minut xenonovou lampou ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, $22,4 \text{ J/cm}^2$). Buňky jsme nechali inkubovat do druhého dne a následně vyhodnotili životaschopnost pomocí AB.

5.6.2 Využití laserové diody jako zdroje záření

Pracovní postup je shodný jako u ozařování xenonovou lampou – příprava roztoků, inkubace a oplachování před ozařováním.

Opláchnuté sféroidy jsme následně ozařovali pět minut laserovou diodou ($\lambda = 685 \text{ nm}$). Byla použita dávka ozáření 450 J/cm^2 . Každá jamka byla ozařována zvlášť. Sféroidy jsme umístili do inkubátoru a druhý den hodnotili životaschopnost pomocí AB.

5.7 Statistické zpracování dat

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

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

Typ použité analýzy a počet opakování je specifikován v titulku k příslušnému obrázku ve výsledcích.

5.8 Konfokální mikroskopie

Pro pokus byly použity sféroidy po 7 dnech růstu v ULA destičce s kulatým dnem, do které byla nasazena koncentrace 500 buněk/jamku. Na světleném mikroskopu jsme si vybrali několik sféroidů pravidelného kulatého tvaru, se kterými jsme následně pracovali. Postup přípravy vzorků a barvení byl proveden ve dvou odlišných postupech (Tab.1).

Tab. 1 Rozdíly mezi 1. a 2. postupem.

	1. postup	2. postup
Permeabilizace	0,5% Triton X-100, inkubace 30 min	0,5% Triton X-100, inkubace 1 h
Koncentrace sondy Actin Green	1 kapka/ml PBS, inkubace 2,5 h	2 kapky/ml PBS, inkubace 2,5 h
Příprava fluorescenční sondy Hoechst 33342	2 ng/ml PBS, inkubace 1 h	10 ng/ml PBS, inkubace 1 h

V prvním kroku byly sféroidy fixovány pomocí 4% paraformaldehydu v SCM. Ten byl ke sféroidům přidán v množství 100 μ l po odsání veškerého média v jamkách. Destička byla uchována přes noc v lednici při 4 °C.

Druhý den jsme destičku ponechali hodinu při pokojové teplotě. Nejprve bylo nutné odsát všechnen paraformaldehyd a přidat 100 μ l PBS. Destička byla opatrně míchána na třepače po dobu 15 minut a tento krok proplachu jsme opakovali ještě jednou. Následně bylo pro permeabilizaci membrán přidáno 100 μ l roztoku Triton X-100 (0,5%) a destička byla ponechána 1 h na třepače. Poté byl všechnen Triton X-100 odsán a opět byl dvakrát přidán PBS pro promytí (2 \times 15minut za stálého opatrného míchání). Odsáli jsme všechnen PBS a přidali 100 μ l fluorescenční sondy Actin Green (konjugát faloidinu s fluoroforem Alexa Fluor 488), která byla připravena naředěním 1 či 2 kapek/ml Actin Green do PBS. Actin Green sloužil pro značení aktinového cytoskeletu (mikrofilamenta). Destičku jsme nechali inkubovat 2,5 hodiny na třepače. Poté jsme sféroidy opláchli a přidali 100 μ l fluorescenčního barviva Hoechst 33342, připravený jako roztok 2 či 10 ng/ml PBS. Hoechst 3342 slouží k obarvení jader. Destičku jsme ponechali 1 h na třepače. Sféroidy jsme poté dvakrát opláchli PBS.

Obarvené sféroidy byly přeneseny na podložní sklíčko s gumovou zobrazovací komůrkou. Odsáli jsme všechnen PBS a přidali projasňující reagentii. Preparát se 5 min

opatrně míchal, než byl fotograficky dokumentován. Takto připravený vzorek jsme fotili pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie (mikroskopický systém Nikon A1+) s objektivem 10× za pomoci 405 a 488 nm laserů v kombinaci s emisními filtry pro DAPI a FITC kanály (modrý a zelený).

5.9 Test invazivity a migrace

Pro oba testy byly vytvořeny sféroidy v 96-jamkových mikrotitračních ULA destičkách s kulatým dnem, do kterých bylo nasazeno 500 buněk/jamku. Sféroidy jsme před pokusy nechali 7 dní růst v inkubátoru při 37 °C.

Pro test invazivity jsme použili jako zdroj ECM GeltrexTM, který jsme přes noc rozmrazili v lednici. Špičky jsme v laminárním boxu umístili do sterilní nádoby a nechali předem zmrazit v mrazáku, jelikož GeltrexTM má obdobné vlastnosti jako Matrigel® a při teplotách nad 15 °C začíná nevratně tvořit hydrogel – je potřeba s ním pracovat rychle a s předchlazeným spotřebním materiálem. Destičku se sféroidy jsme nechali zchladit 10 min v lednici a poté ji umístili na vymraženou chladicí podložku v laminárním boxu. Automatickou pipetou jsme opatrně odsáli 150 µl média tak, aby nedošlo ke kontaktu se sféroidem a předešlo se jeho poškození. Poté jsme ke sféroidům pipetovali 50 µl GeltrexuTM, přičemž jsme dbali na to, aby sféroidy zůstali ve středu jamky a nedošlo ke tvorbě bublin. Jako kontrola nám sloužily sféroidy, ke kterým bylo místo GeltrexuTM pipetováno čisté SCM. Destičku jsme umístili do inkubátoru a nechali gel hodinu tuhnout při 37 °C. Poté jsme opatrně gel převrstvili přidáním 100 µl SCM média. Destička s takto připravenými vzorky byla přenesena do inkubátoru na mikroskop a v pravidelných intervalech byla snímána pomocí DIC mikroskopie s objektivem 10×. Veškeré přidávání roztoků probíhalo reverzním pipetováním, aby nedošlo ke tvorbě bublin. Navíc je nutné udržet sféroid uprostřed jamky, aby bylo možné jeho mikroskopické hodnocení (korektní měření).

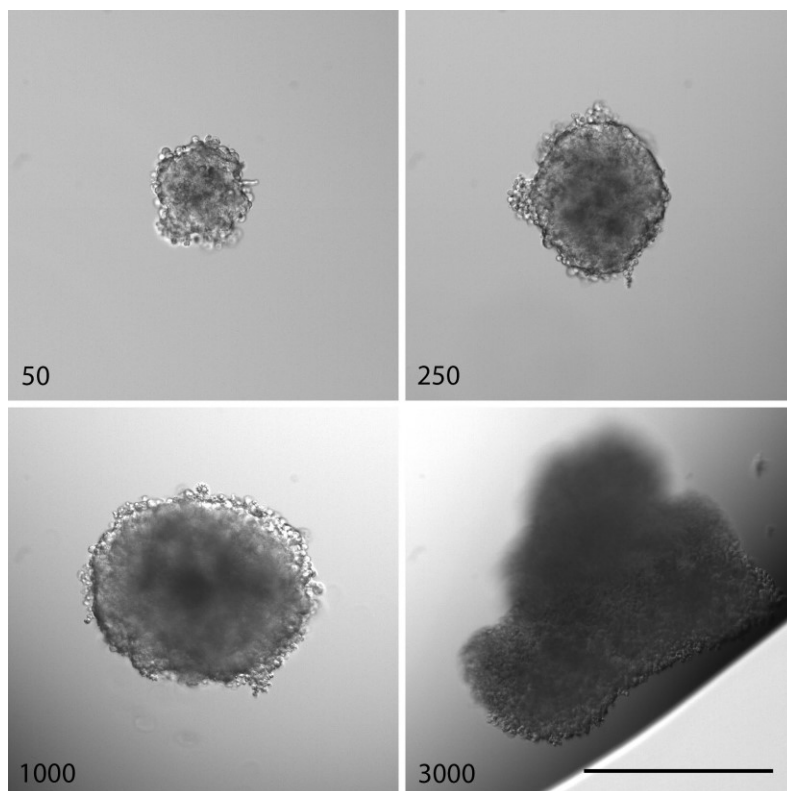
Pro test migrace jsme opatrně přenesli 100 µl média i se sféroidem z původní ULA destičky s kulatým dnem do kultivační destičky s plochým dnem, ke kterému mohou buňky přilnout. Pro eliminaci tvorby bublin bylo pipetováno reverzně. Destička byla uchovávána v inkubátoru a v pravidelných intervalech byly pořizovány snímky v DIC s objektivem 10×.

6 VÝSLEDKY

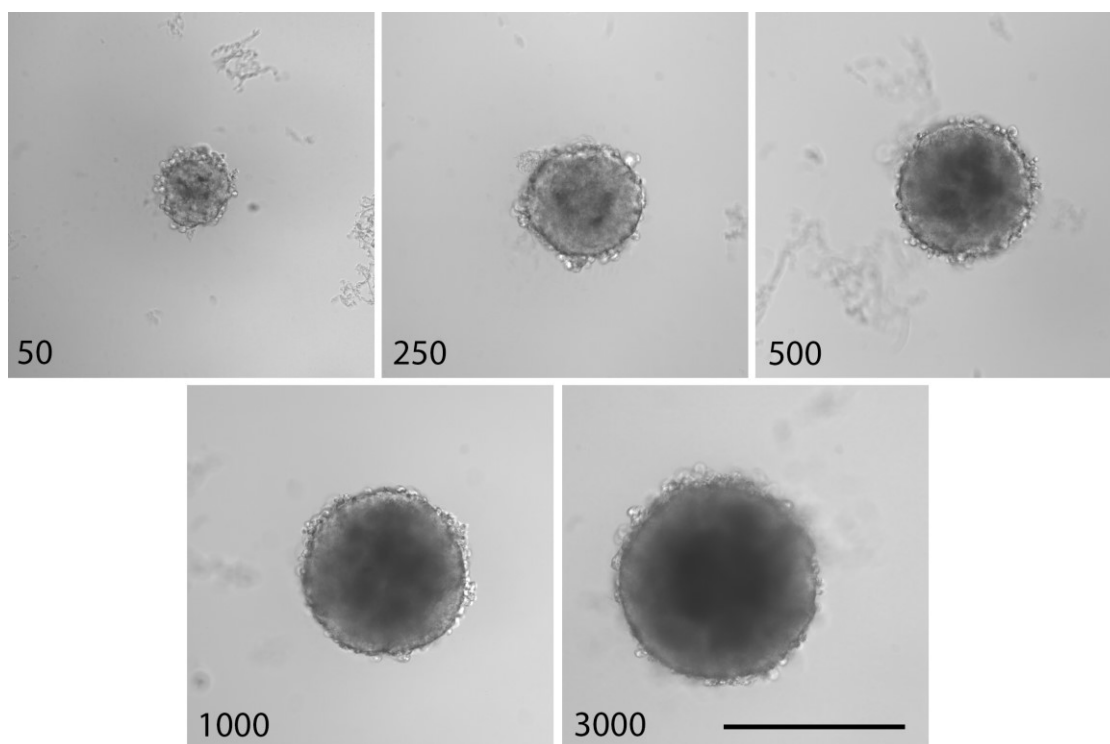
6.1 Stanovení optimální počáteční koncentrace buněk pro tvorbu sféroidů

Jelikož velikost sféroidu ovlivňuje schopnost dostatečně napodobit reálné vlastnosti uvnitř nádoru, je nutné při jejich tvorbě zvolit vhodnou počáteční koncentraci buněk. Ideální velikost je taková, při které sféroid obsahuje nekrotické jádro, buňky v klidovém stádiu a vrstvu proliferujících buněk (dle literatury se tato velikost pohybuje okolo 400-600 μm). Sféroidy sloužící jako model nádoru pro další experimenty musí být také kultivovány dostatečnou dobu, jelikož u kultivace kratší než 2 dny obvykle nejsou vytvořeny pevné vazby mezi buňkami. V experimentálních podmínkách se často využívá doba inkubace delší než 4 dny (v závislosti na typu buněčné linie) (Katt et al., 2016). My jsme pro tvorbu sféroidů z buněčné linie HeLa využívaných pro další experimenty zvolili inkubační čas 7 dní.

Pro metodu visuté kapky jsme použili počáteční koncentrace 50, 250, 1000 a 3000 buněk/kapku, jejichž 7-denní sféroidy můžeme vidět na Obrázku 21. Pro metodu ULA destiček byla zvolena počáteční koncentrace 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku. Sféroidy staré 7 dní vytvořené touto metodou jsou zobrazeny na Obrázku 22. Fotografie byly pořizovány pomocí mikroskopie DIC se zvětšením 10 \times . Pro 7-denní tvorbu sféroidů činila optimální počáteční koncentrace buněk dle jejich vzhledu u obou metod 250 buněk/kapku až 1000 buněk/kapku. U nižší koncentrace během sedmi dnů nedošlo k tvorbě dostatečně velké masy buněk. Naopak, u vyšší koncentrace jsou sféroidy z ULA destiček příliš velké (bylo by potřeba použít kratší dobu pro tvorbu sféroidů) a u visuté kapky zase docházelo k tvorbě nepravidelné masy (ve 40 μl je málo prostoru a objemu média pro tvorbu pravidelného sféroidu těchto rozměrů).



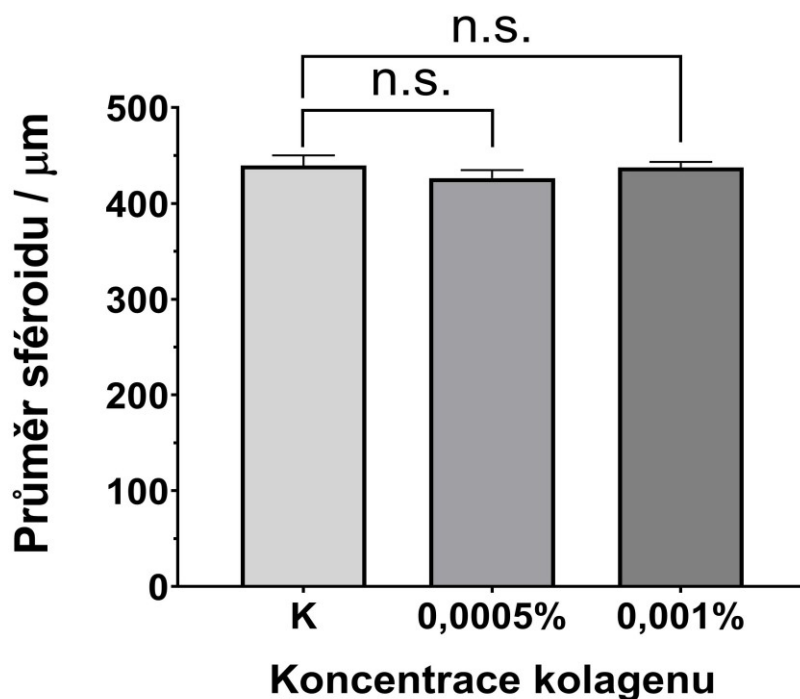
Obrázek 21. Sféroidy s počáteční koncentrací 50, 250, 1000 a 3000 buněk/kapku 7. den od nasazení vytvořené metodou visuté kapky. Měřítko odpovídá 500 μm .



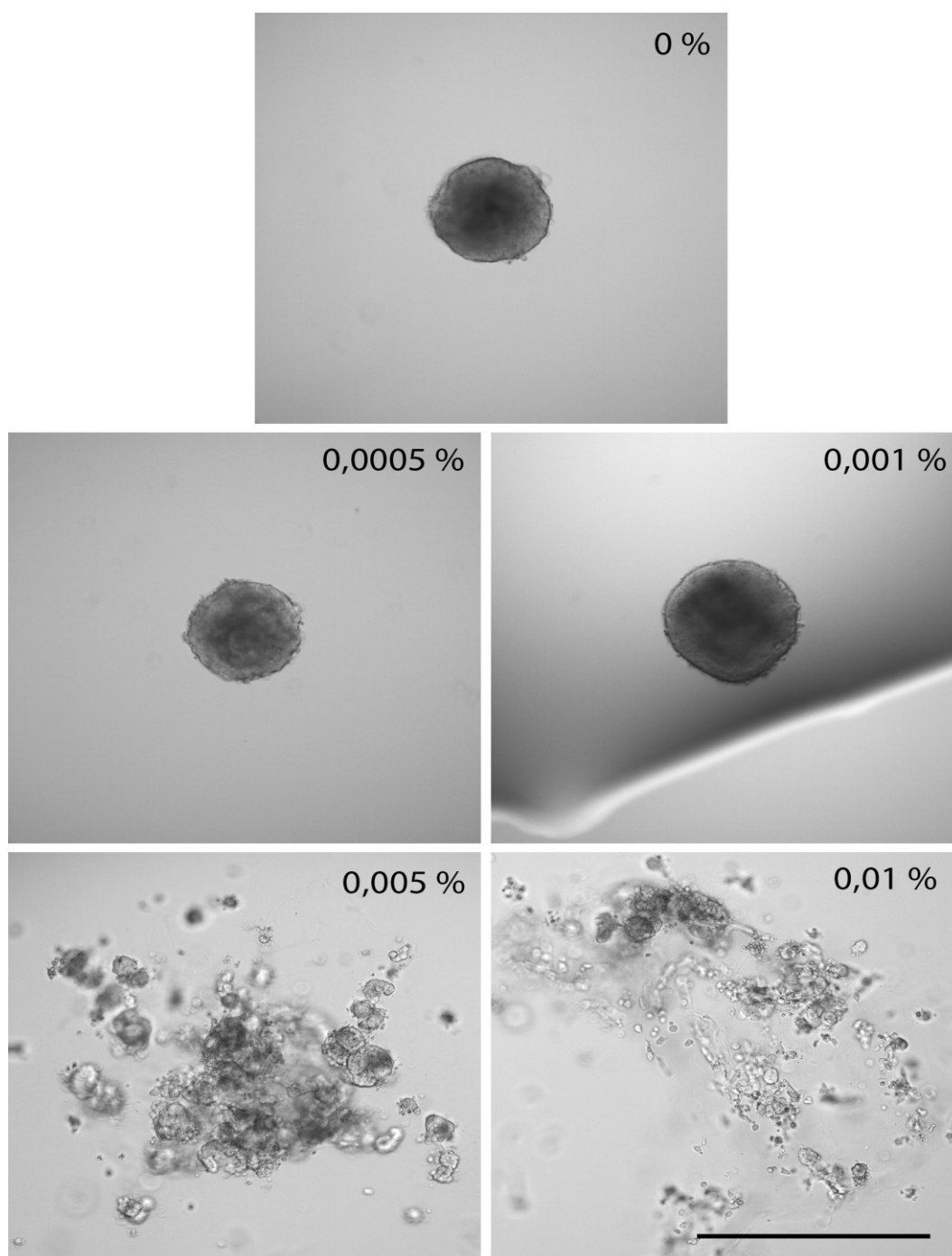
Obrázek 22. Sféroidy s počáteční koncentrací 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku 7. den od nasazení vytvořené pomocí ULA destiček. Měřítko odpovídá 500 μm .

6.2 Využití kolagenu jako nástroje pro tvorbu kompaktnějších sféroidů

Pro experiment jsme použili sféroidy vytvořené metodou visuté kapky s počáteční koncentrací 500 buněk/kapku, kde SCM médium obsahovalo kolagen ve finálních koncentracích 0,01 %, 0,005 %, 0,001 % a 0,0005 %. Kolagen s buňkami po převrácení destičky sedimentuje na dno kapky a má přispět k buněčné agregaci a formování pevného sféroidu s těsnějšími mezibuněčnými vazbami. Sféroidy včetně kontroly s čistým médiem byly pozorovány DIC mikroskopií s objektivem 10× a byl měřen jejich průměr 7. den od nasazení. Při použití vyšších koncentrací kolagenu v roztoku (0,01 % a 0,005 %) v našem experimentu nedošlo ke vzniku jednoho sféroidu ale k vytvoření několika menších shluků buněk až sféroidů (Obr. 24). To připisujeme vyšší viskozitě prostředí, ve kterém nesedimentují všechny buňky gravitací na dno jamky a zůstanou roztroušeny v celém objemu, což vede k tvorbě buněčných agregátů až sféroidů na několika místech zároveň. Při využití koncentrací 0,001 % a 0,005 % byly sféroidy vytvořeny, avšak jejich průměr se nelišil od sféroidů kultivovaných v čistém SCM (Obr. 23). Nepozorovali jsme ani rozdíly v morfologii sféroidů kultivovaných médiu s či bez kolagenu (Obr. 24).



Obrázek 23. Průměr sféroidů vytvořených ve visuté kapce v médiu obohaceném o kolagen v koncentracích 0,001 % a 0,0005 % v porovnání s průměrem kontrolního sféroidu kultivovaném v čistém SCM. Legenda: t-test, $n = 4$, * $p < 0,033$; ** $p < 0,002$ a *** $p < 0,001$.



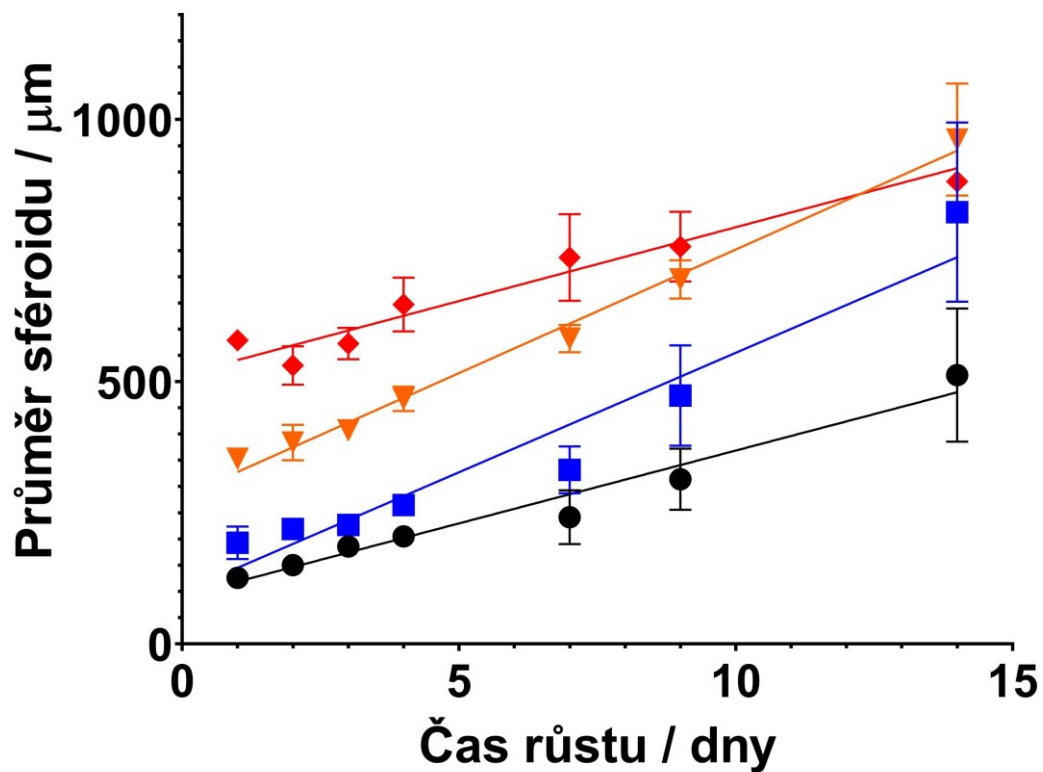
Obrázek 24. Sféroidy vytvořené pomocí visuté kapky po 7 dnech inkubace s různými koncentracemi kolagenu. Měřítko odpovídá 700 μm .

6.3 Sledování růstu sféroidů

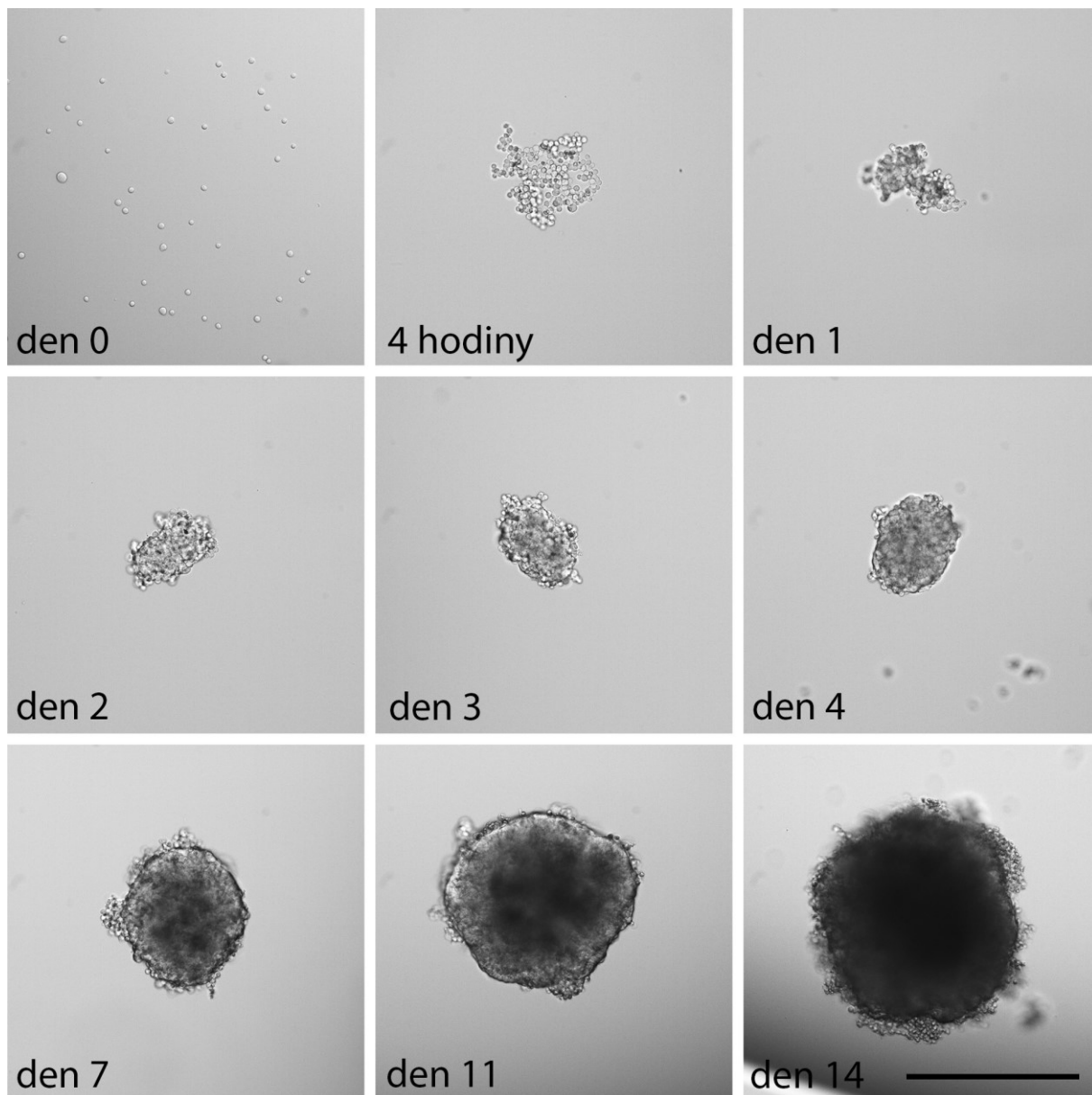
Růst sféroidů vytvořených pomocí obou metod jsme sledovali DIC mikroskopií se zvětšením 10× po dobu 14 dnů, během kterých byly sféroidy fotografovány a byl měřen jejich průměr.

Sféroidy vytvořené ve visuté kapce v koncentracích 50, 250, 1000 a 3000 buněk/kapku byly dokumentovány 1., 2., 3., 4., 7., 9. a 14. den od jejich vytvoření (Obr. 25 a 26). Ve všech koncentracích byla lineární závislost růstu. Nejrychlejší růst vykazovaly koncentrace 250 a 1000 buněk/kapku. Průběh růstu u koncentrace 250 buněk/kapku je fotograficky zaznamenán na Obrázku 26. V den nasazení jsme mohli vidět rozptýlené buňky v kapce buněčné suspenze. Po čtyřech hodinách již bylo možné zaznamenat gravitační sedimentaci a spontánní agregaci buněk do agregátu nepravidelného tvaru. 7. den se buňky formovaly do ideálního sféroidu s různými zónami proliferace.

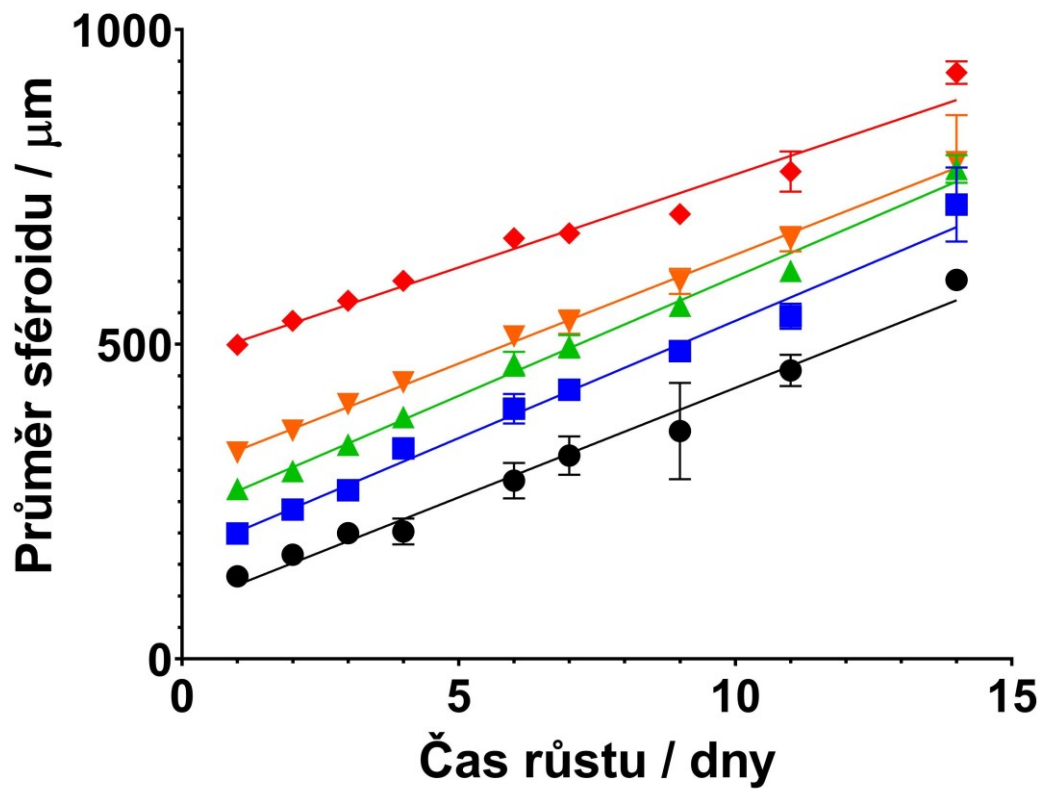
Sféroidy v ULA destičce byly dokumentovány 1., 2., 3., 4., 6., 7., 9., 11. a 14. od nasazení (Obr. 27). Byly nasazeny koncentrace 50, 250, 500, 1000 a 3000 buněk/jamku. Růst ve všech koncentracích vykazoval taktéž lineární závislost. Rychlejší proliferace buněk byla zaznamenána ve sféroidech s počáteční koncentrací do 500 buněk/jamku. U vyšších koncentrací byl růst o něco pomalejší. Fotografická dokumentace růstu sféroidu s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku je znázorněna na Obrázku 28. V den nasazení jsme ihned po centrifugaci ULA destičky s buněčnou suspenzí mohli pozorovat monovrstvu buněk na dně jamky. První den již byla patrná tvorba agregátu, ve kterém se postupně během následujících dnů tvořily pevnější vazby mezi buňkami a docházelo tak k tvorbě sféroidu. 7. den buňky vytvořily kompaktní sféroid, vhodný pro experimentální použití.



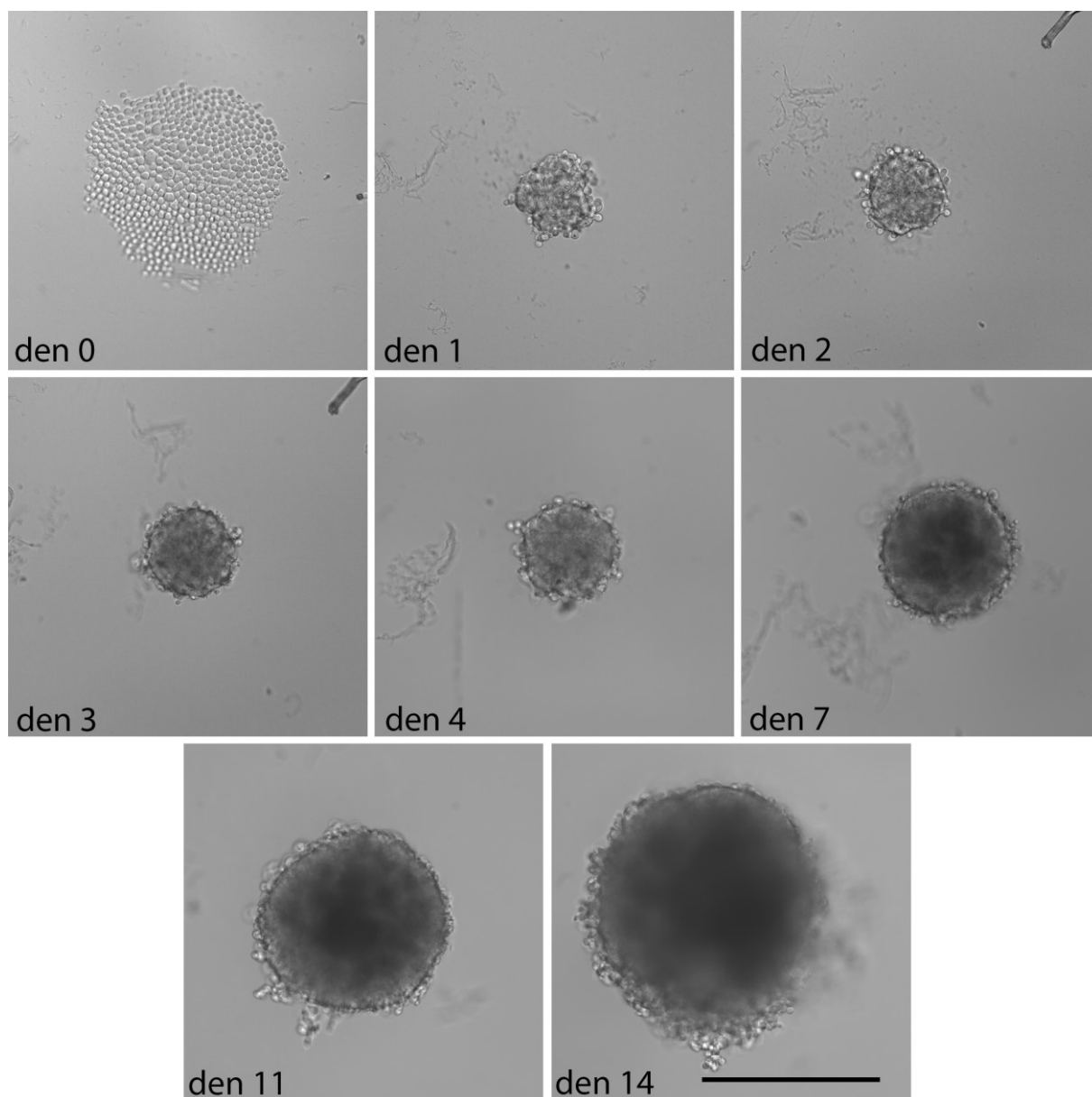
Obrázek 25. Průměry sféroidů vytvořených visitou kapkou v závislosti na čase, po který se nechaly růst (den 1. – 14.). Počáteční koncentrace buněk byly: 50 (●), 250 (■), 1000 (▼) a 3000 (◆) buněk/kapku.



Obrázek 26. Růst sféroidu vytvořených visutou kapkou s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku den 0. – 14. Měřítko odpovídá 500 μm .



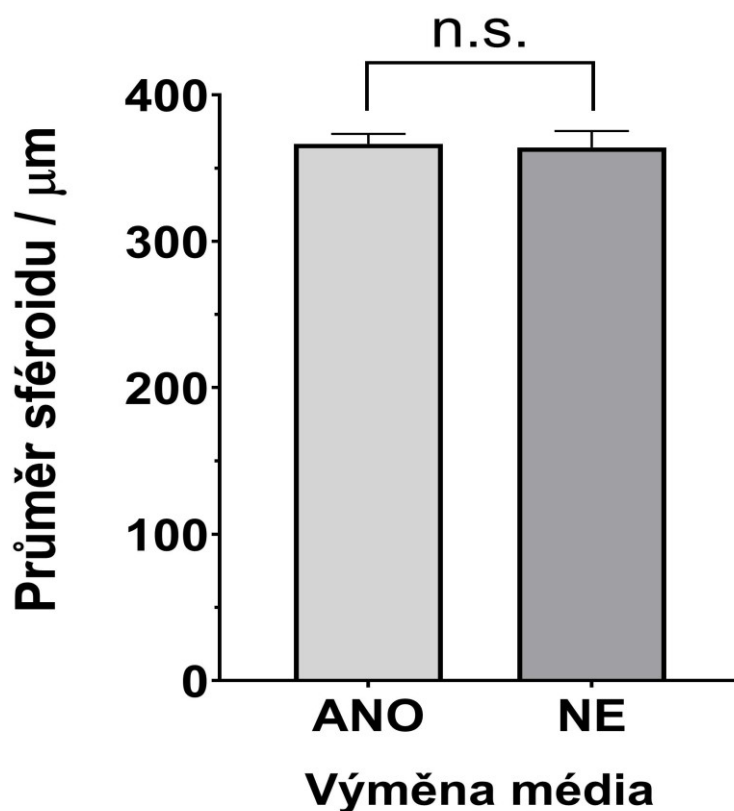
Obrázek 27. Průměry sféroidů vytvořených pomocí ULA destičky v závislosti na čase, po který se nechaly růst (den 1. - 14.). Počáteční koncentrace buněk byly: 50 (●), 250 (■), 500 (▲), 1000 (▼) a 3000 (◆) buněk/jamku.



Obrázek 28. Růst sféroidu v ULA destičce s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku den 0. -14. Měřítko odpovídá 500 μm .

6.4 Vliv výměny média na růst sféroidů v ULA destičce

U sféroidů připravených pomocí ULA destičky a s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku bylo vyměněno médium 2. a 4. den od nasazení. Vliv výměny se porovnával 7. den růstu se skupinou sféroidů připravených stejným způsobem, ale bez výměny média. Průměry sféroidů s výměnou a bez výměny ukazuje Obrázek 29, z něhož je patrné, že výměna média (a tudíž odstranění odpadních látek a dodání nových živin) neměla na růst sféroidů v ULA destičce žádný vliv.

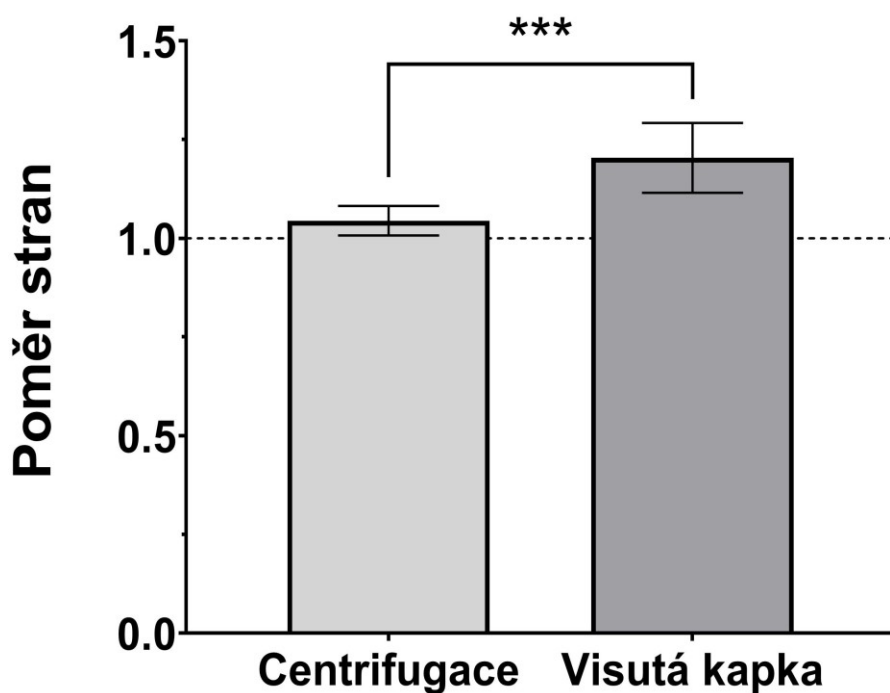


Obrázek 29. Vliv výměny média na průměr sféroidů vytvořených v ULA destičce.
Legenda: t-test, $n = 14$, $*p < 0,033$; $**p < 0,002$ a $***p < 0,001$.

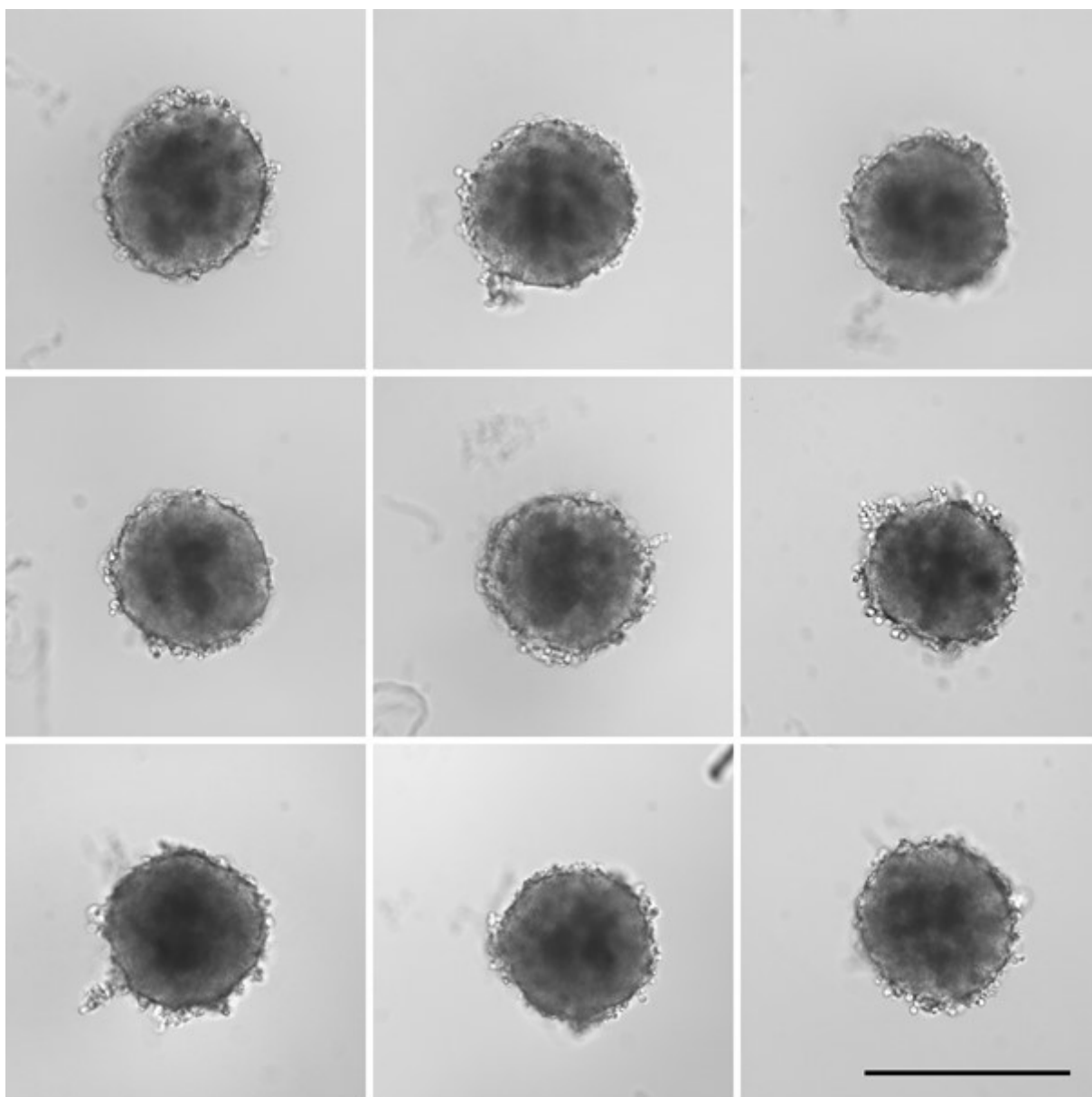
6.5 Uniformita sféroidů

Jednotnost 7-denních sféroidů, které byly vytvořeny výše uvedenými metodami se hodnotila porovnáním poměru delší ku kratší straně sféroidu, který měl průřez ve tvaru elipsy až kruhu. Čím více se tento poměr pohyboval okolo 1,0, tím pravidelnější a kulatější sféroid byl. Naopak čím více byl tento poměr >1 , tím oválnější či nepravidelný sféroid byl.

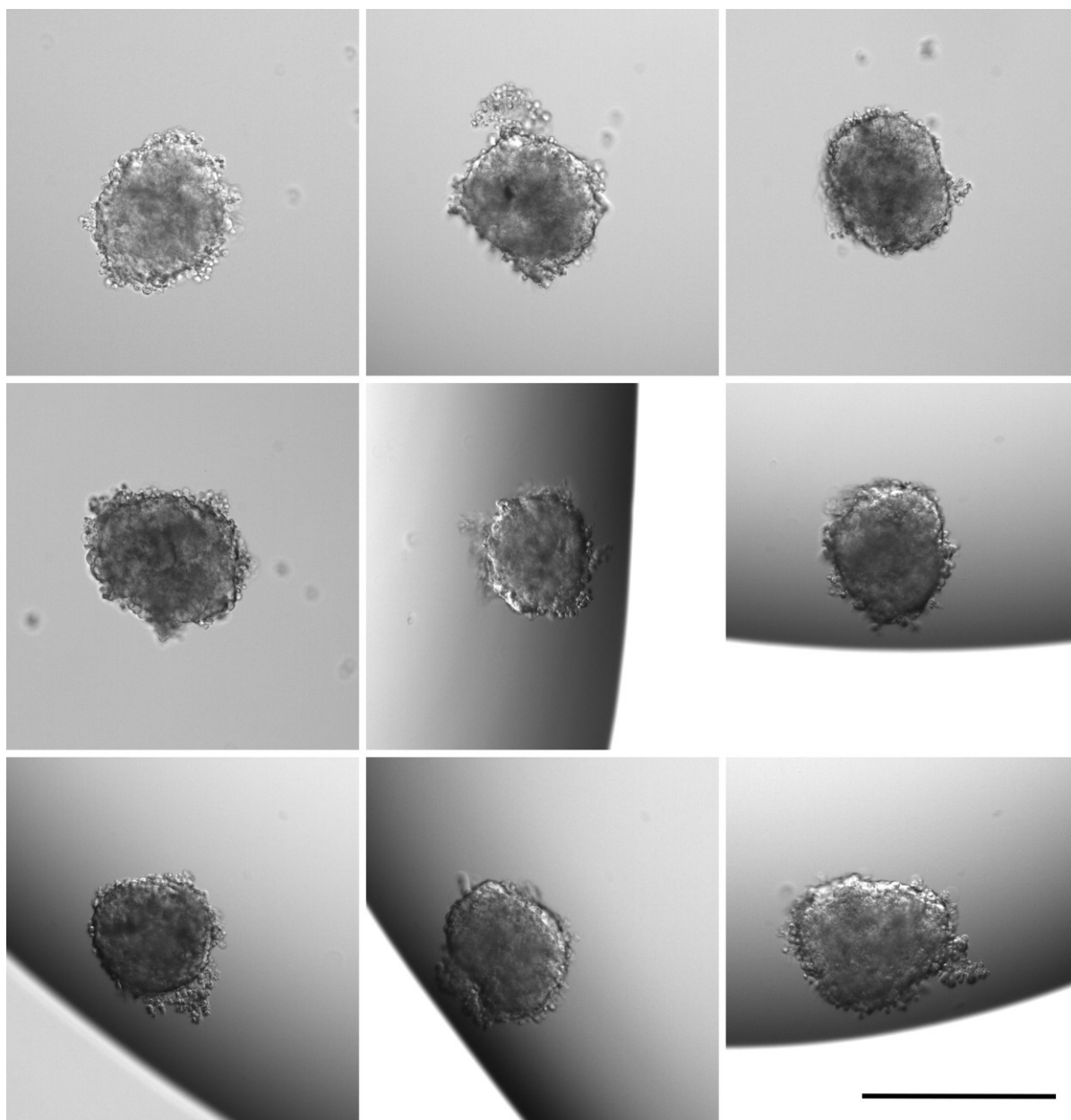
Z Obrázku 30 můžeme vyvodit, že příprava sféroidů pomocí centrifugace v ULA destičkách nám v porovnání s metodou visuté kapky umožnila lépe dosáhnout sféroidů s požadovaným sférickým tvarem (ne tedy protáhlých či zploštělých sféroidů). Sféroidy v ULA destičce jsou fotograficky zdokumentovány na Obrázku 31. Sféroidy připravené pomocí visuté kapky můžeme vidět na Obrázku 32.



Obrázek 30. Uniformita sféroidů vyjádřená jako poměr na sebe kolmých průměrů průřezu v závislosti na použité metodě. Legenda: t-test, $n = 9$, $*p < 0,033$; $**p < 0,002$ a $***p < 0,001$.



Obrázek 31. Uniformita sféroidů vytvořených pomocí ULA destiček. Měřítko odpovídá 500 μm .

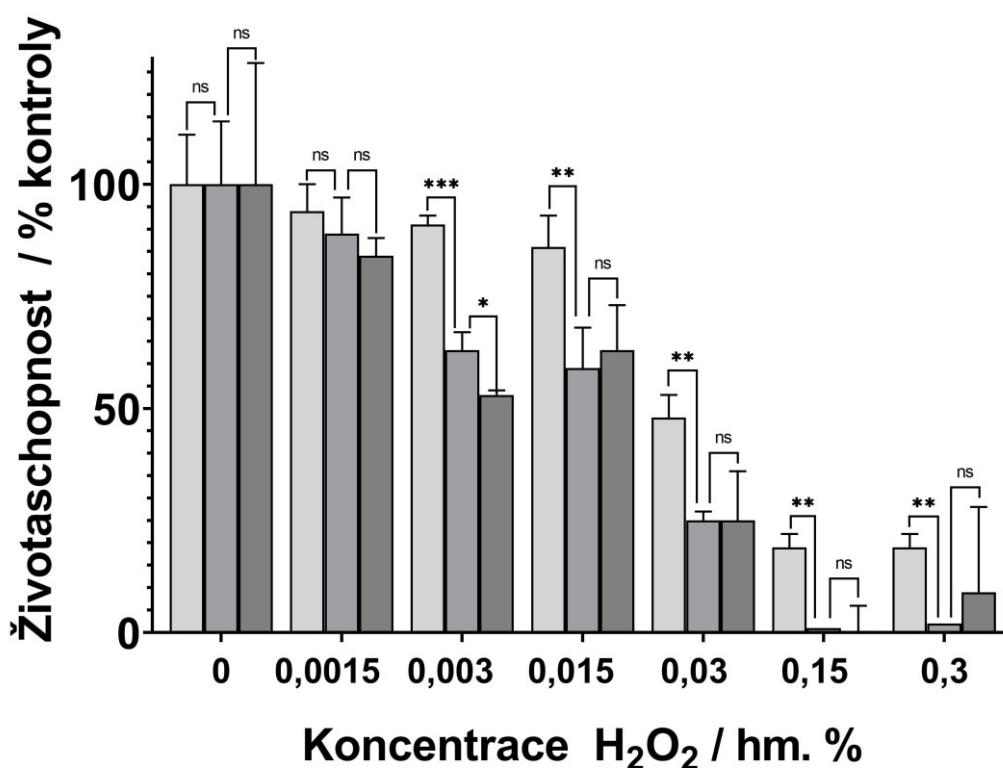


Obrázek 32. Uniformita sféroidů vytvořených metodou visuté kapky. Měřítko odpovídá 500 μm .

6.6 Optimalizování času inkubace sféroidů s AB

Pro experiment byly použity 7-denní sféroidy vytvořené pomocí ULA destiček s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku. Jako cytotoxická látka byl přidán H_2O_2 v koncentračním rozmezí 0,0015 – 0,3 hm. %. Pro pozadí zde bylo použito čisté médium neobsahující buňky.

Obrázek 33 zobrazuje vyhodnocení životaschopnosti buněk ve sféroidech po 2 h, 4 h a 24 h inkubace s AB. Inkubace po dobu 24 h byla příliš dlouhá, jelikož i při použití nejvyšších koncentrací H_2O_2 , která je pro buňky letální, bylo po 24 h inkubace detekováno 19 % živých buněk. To je dáno pravděpodobně spontánní redukcí AB na fluorescenční produkt, popř. malým množstvím přeživších buněk – v obou případech by pak docházelo při delší inkubaci s AB k jeho redukcí na dostatečné množství fluorescenčního produktu, který jsme schopní detekovat. Mezi 4 h a 2 h inkubací nebyly většinou patrné statisticky významné rozdíly. Pro vyhodnocování životaschopnosti buněk v dalších experimentech jsme se rozhodli použít inkubační čas sféroidů s AB 4 h, který ve většině případů vykazoval menší chybu měření v krajních koncentracích (kontrola a vysoké dávky cytotoxické látky).

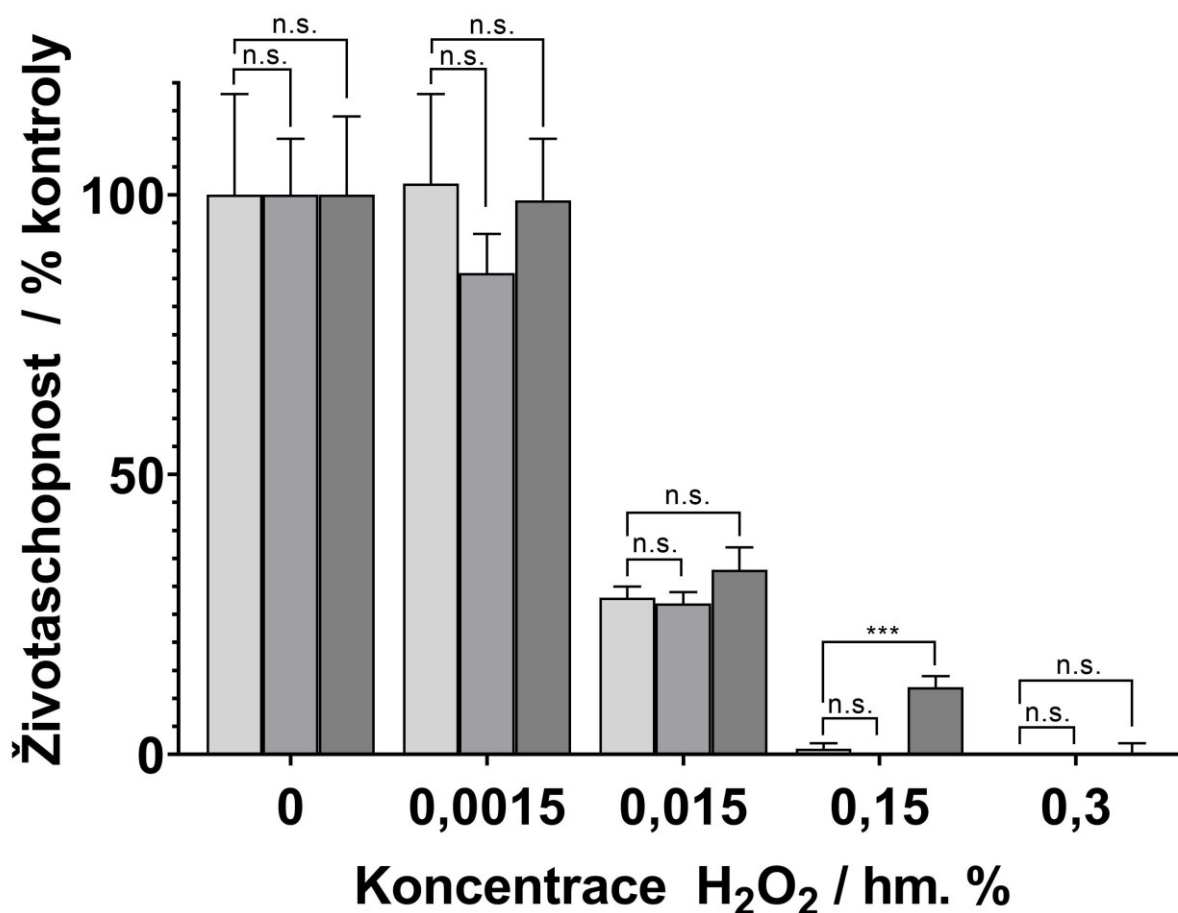


Obrázek 33. Vyhodnocení životaschopnosti buněk ve sféroidech po inkubaci s AB po 24 h (■), 4 h (■) a 2 h (■). Legenda: t-test, n = 4, *p < 0,033; **p < 0,002 a ***p < 0,001.

6.7 Porovnání citlivost AlamarBlue™, PrestoBlue™, AlamarBlue™ HS

Porovnání vhodnosti reagensů pro testy životaschopnosti probíhalo na 7-denních sféroidech s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku vytvořených pomocí ULA destičky. Sféroidy byly ovlivněny H₂O₂ jako cytotoxickým činidlem v koncentracích 0,0015 – 0,3 %.

Rozdíly v citlivosti jednotlivých činidel pro vyhodnocení životaschopnosti nebyly většinou statisticky významné (Obr. 34). Nejvíce odlišný výsledek jsme zaznamenali u sféroidů ošetřených 0,15% H₂O₂, kde při použití činidla PB bylo ve sféroidech vyhodnoceno 12 ± 2 % buněk jako metabolicky aktivních (živých). Při stejné koncentraci H₂O₂ však činidla AB a AB HS vyhodnotila téměř všechny buňky ve sféroidech jako mrtvé. Tento rozdíl může být dán výrobcem udávanou vyšší citlivostí PB oproti AB a AB HS.



Obrázek 34. Porovnání citlivosti AlamarBlue™ (■), Alamar Blue™ HS (■) a PrestoBlue™ (■) pro vyhodnocení životaschopnosti buněk na základě jejich metabolické aktivity po použití H₂O₂ jako cytotoxické látky. Legenda: t-test, n = 4, *p < 0,033; **p < 0,002 a ***p < 0,001.

6.8 Fotodynamická aktivita

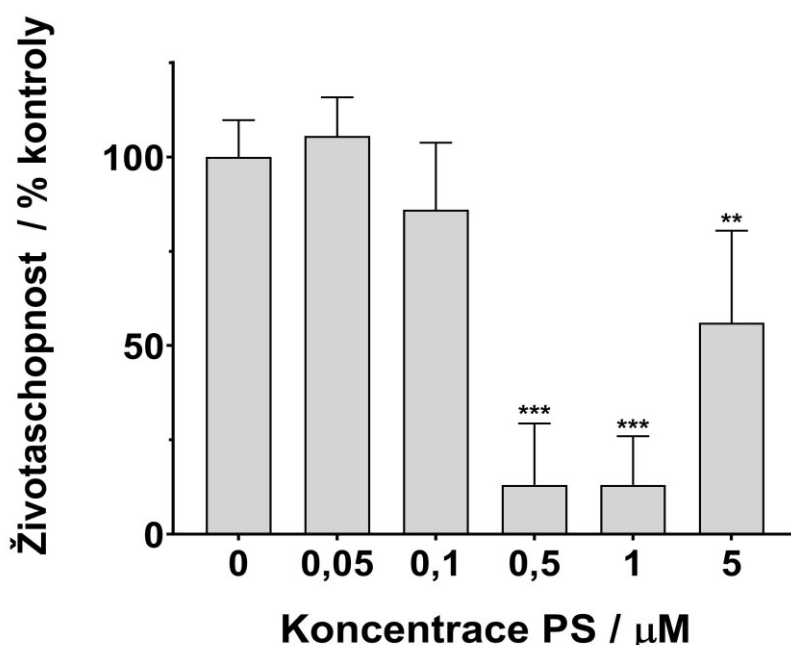
Pro všechny experimenty byly využity 7 dní staré sféroidy připravené pomocí ULA destiček s kulatým dnem a s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku. Sféroidy byly vytvořeny z buněčné linie HeLa.

Vyhodnocení experimentů bylo provedeno stanovením hodnoty střední efektivní koncentrace (EC_{50}). Hodnota EC_{50} představovala koncentraci testovaného PS, která způsobila po ozáření usmrcení 50 % buněk v porovnání s neovlivněnými buňkami.

6.8.1 Využití Xe výbojky jako zdroje záření

6.8.1.1 P40

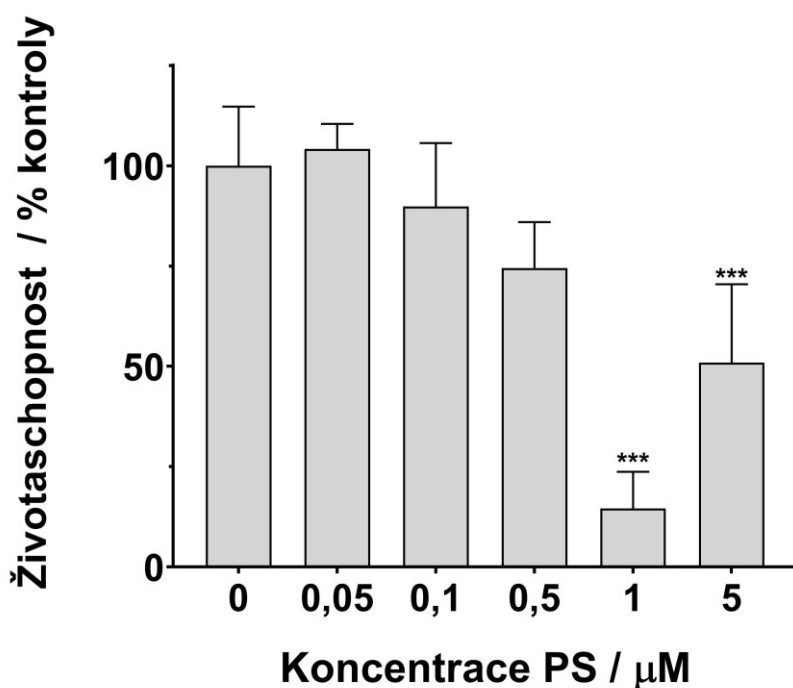
Pro hodnocení fototoxicity této látky byly využity koncentrace, které se pohybovaly v rozmezí od 0,05 – 5 μM . Ze získaných hodnot zobrazených na Obrázku 35 jsme stanovili EC_{50} , která činila $\approx 0,21 \mu\text{M}$ (pokud nebereme v potaz nejvyšší koncentraci). Nejvíce letální účinek na buňky měly koncentrace 0,5 a 1 μM , kdy po ozáření při jejich použití došlo k poklesu životaschopnosti až na 13 %. Zvýšením koncentrace PS na 5 μM jsme dosáhli poklesu životaschopnosti pouze na 56 %.



Obrázek 35. Závislost životaschopnosti buněk na koncentraci studované látky P40 po ozáření Xe výbojkou. Legenda: ANOVA, $n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$.

6.8.1.2 P44

Účinnost tohoto PS byla sledována za použití stejných koncentrací jako u předchozí látky, a to 0,05 – 5 μM . Ze získaných hodnot zobrazených na Obrázku 36 jsme stanovili EC_{50} , která činila $\approx 0,66 \mu\text{M}$ (pokud nebereme v potaz nejvyšší koncentraci). Nejvíce letální účinek na buňky měla koncentrace 1 μM , kdy po ozáření došlo ke snížení životaschopnosti na 15 %. Při použití koncentrace 5 μM pak opět došlo k nárůstu životaschopnosti, tentokrát na 51 %.

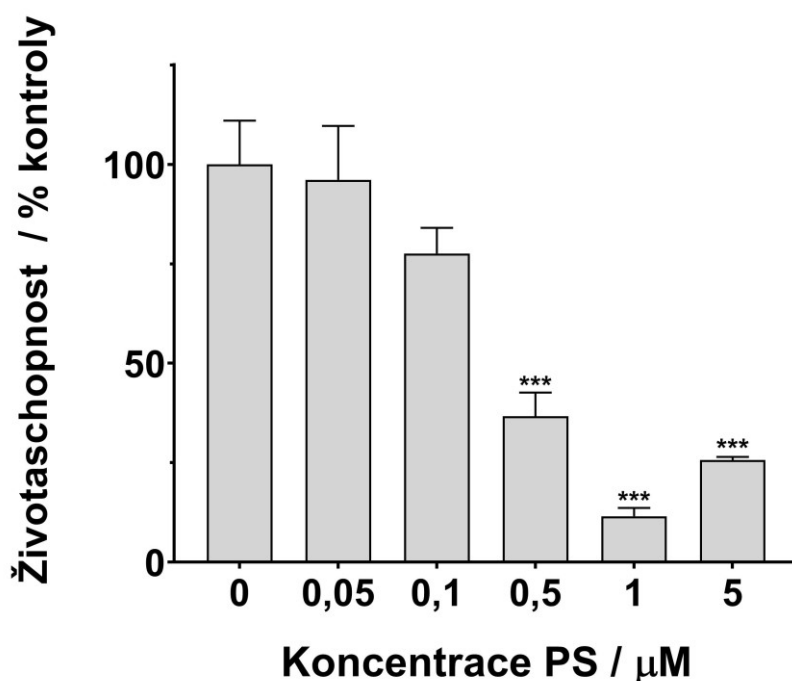


Obrázek 36. Závislost životaschopnosti buněk na koncentraci studované látky P44 po ozáření Xe výbojkou. Legenda: ANOVA, $n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$.

6.8.2 Využití laserové diody jako zdroje záření

6.8.2.1 P40

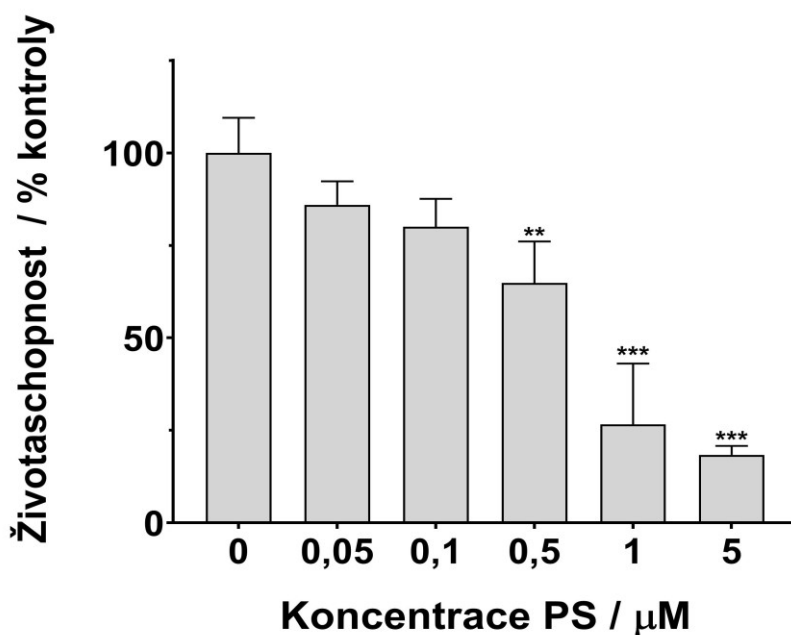
Pro hodnocení fototoxicity tohoto PS byly využity opět koncentrace v rozmezí od 0,05 – 5 μM . Ze získaných hodnot zobrazených na Obrázku 37 jsme stanovili EC_{50} , která činila $\approx 0,28 \mu\text{M}$ (pokud nebereme v potaz nejvyšší koncentraci). Nejvíce letální účinek na buňky měla koncentrace 1 μM , kdy po ozáření došlo ke snížení životaschopnosti na 12 %. Při použití koncentrace 5 μM došlo k nárůstu na 26 % - což ukazuje na vyšší fotodynamický účinek látky při použití výrazně vyšší dávky ozáření.



Obrázek 37. Závislost životaschopnosti buněk na koncentraci studované látky P40 po ozáření laserovou diodou. Legenda: ANOVA, $n = 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$.

6.8.2.2 P44

Fototoxicita tohoto PS byla hodnocena v koncentracích 0,05 – 5 μM . Ze získaných hodnot zobrazených na Obrázku 38 jsme stanovili EC_{50} , která činila 0,67 μM . Tento PS vykazoval s rostoucí koncentrací větší schopnost usmrtit buňky. Při použití koncentrace 1 μM došlo k poklesu životaschopnosti na 27 %. Nejvíce letální účinek však měla koncentrace 5 μM , při které došlo k poklesu životaschopnosti na 18 %. I zde se ukázalo ozařování laserem u nejvyšší koncentrace jako účinnější.



Obrázek 38. Závislost životaschopnosti buněk na koncentraci studované látky P44 po ozáření laserovou diodou. Legenda: ANOVA, $n = 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$.

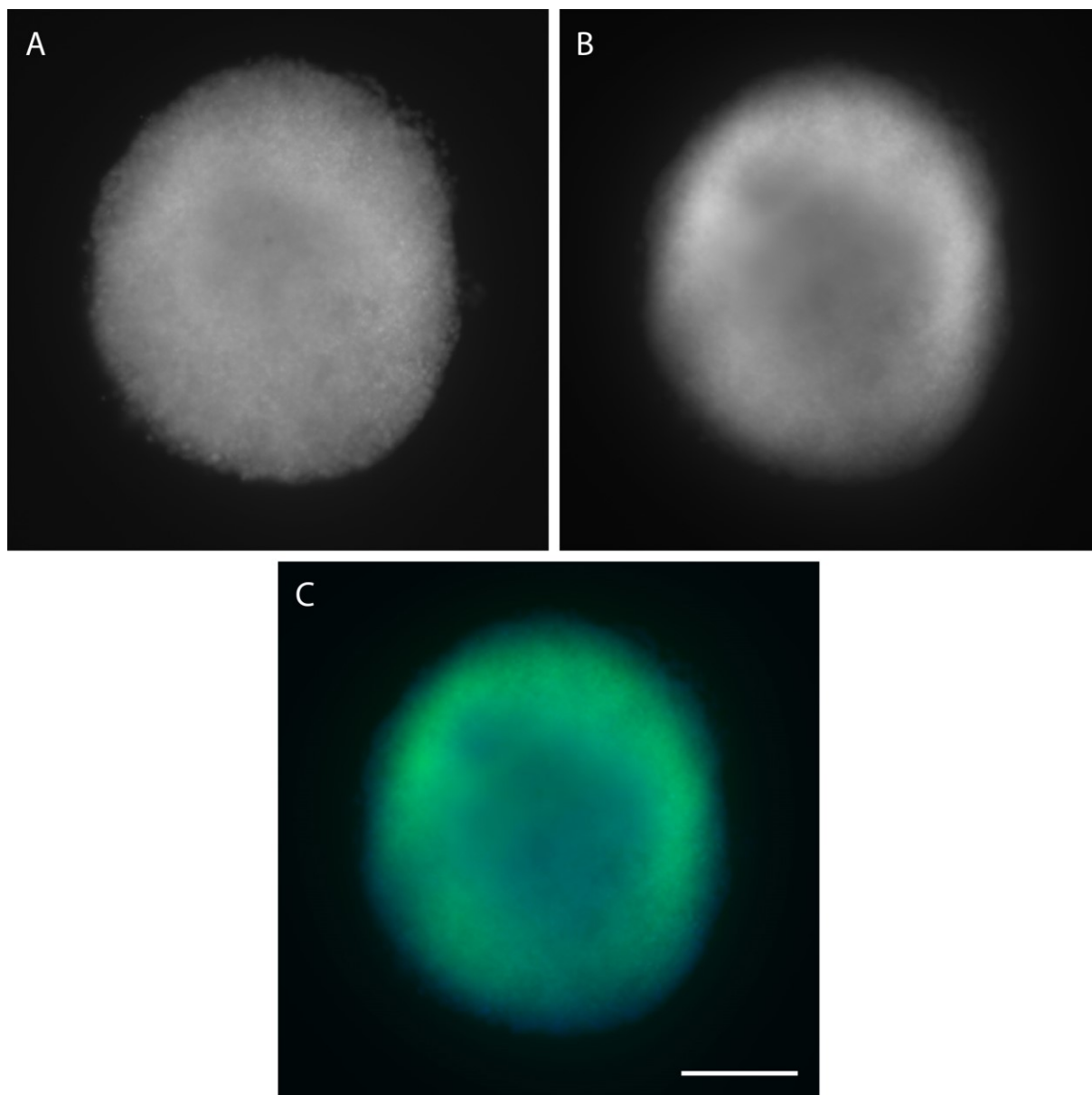
6.9 Zobrazení sféroиду konfokální mikroskopií

Experiment byl proveden na 7-denních sféroidech vytvořených pomocí ULA destičky s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku. K barvení buněk ve sféroиду byly použity dvě fluorescenční sondy. Jádra byla značena pomocí fluorescenčního barviva Hoechst 33342, které emituje záření v modré části spektra. Aktinový cytoskelet byl značen pomocí fluorescenční sondy Actin Green, která emituje záření v zelené části spektra. Jako zdroj excitačního záření byl použit laser s vlnovými délkami 405 nm pro DAPI (modrá emise) a 488 nm pro FITC (zelená emise). U obou vzorků bylo nasnímáno 35 rovin zaostření, které byly složeny projekcí maximální intenzity signálu. Obrázek 39 zobrazuje tentýž vzorek jako Obr. 40, jen bylo k jeho zobrazení vyžito fluorescenční mikroskopie. Sféroid zde (především v zeleném kanálu, kde je vizualizovaný cytoskelet) vykazuje malé množství detailů oproti následujícím snímkům vyfoceným konfokální mikroskopií.

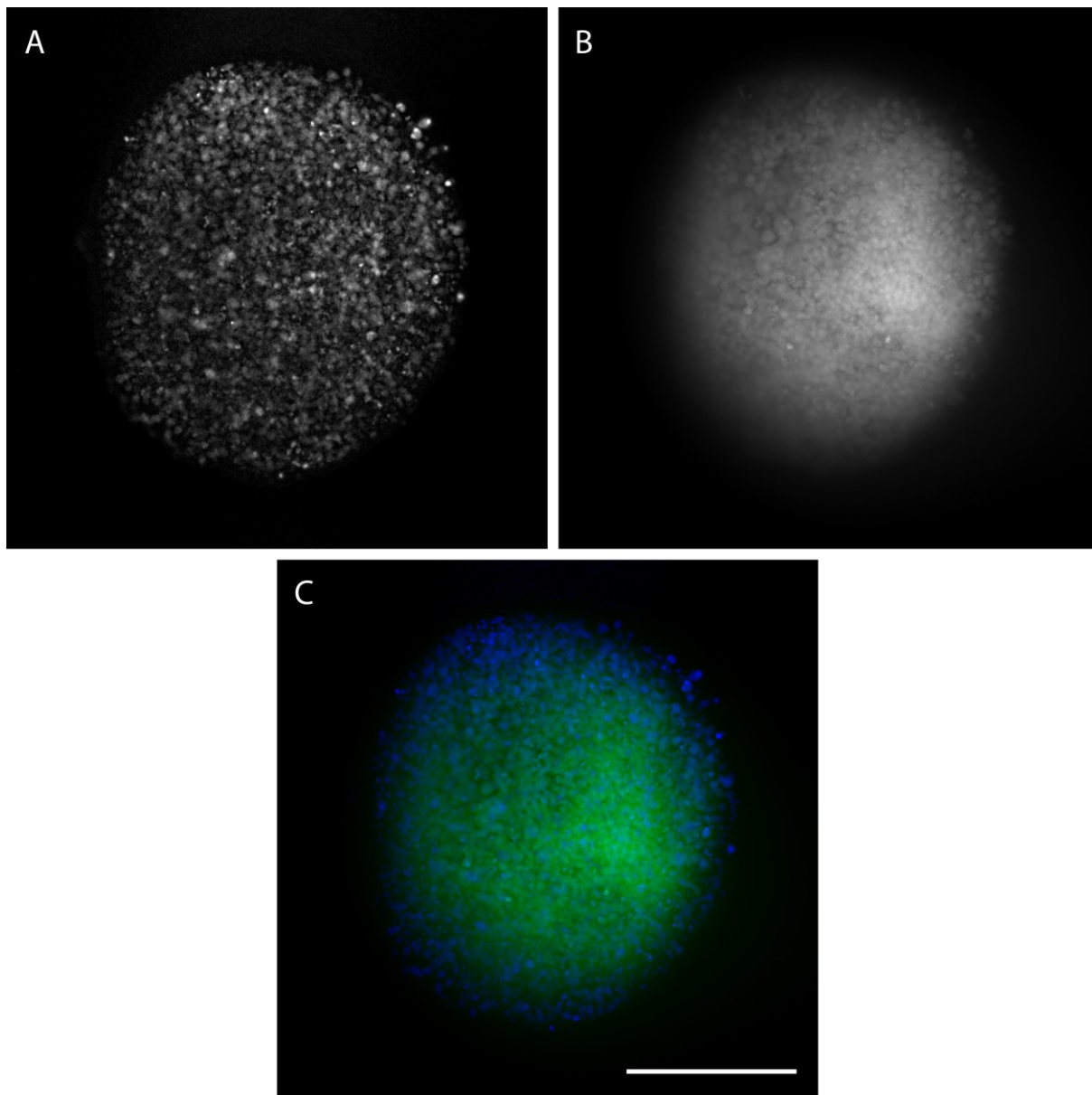
Metodu jsme provedli dvěma odlišnými postupy. V prvním postupu (Obr. 40) byly použity následující koncentrace fluorescenčních sond: Actin Green 1 kapka/ml PBS a Hoechst 33342 2 ng/ml PBS. Tento postup však musel být upraven, jelikož nedošlo k dosažení dostatečného fluorescenčního signálu. Především obarvení jader bylo nedostačující.

Ve druhém postupu (Obr. 41) jsme tedy zvýšili koncentraci fluorescenčních sond: ActinGreen 2 kapky/ml PBS, Hoechst 33342 10 ng/ml PBS. Prodloužili jsme také inkubační čas buněk s činidlem Triton X (0,5%), které slouží pro permeabilizaci membrán, z 30 minut na 1 h.

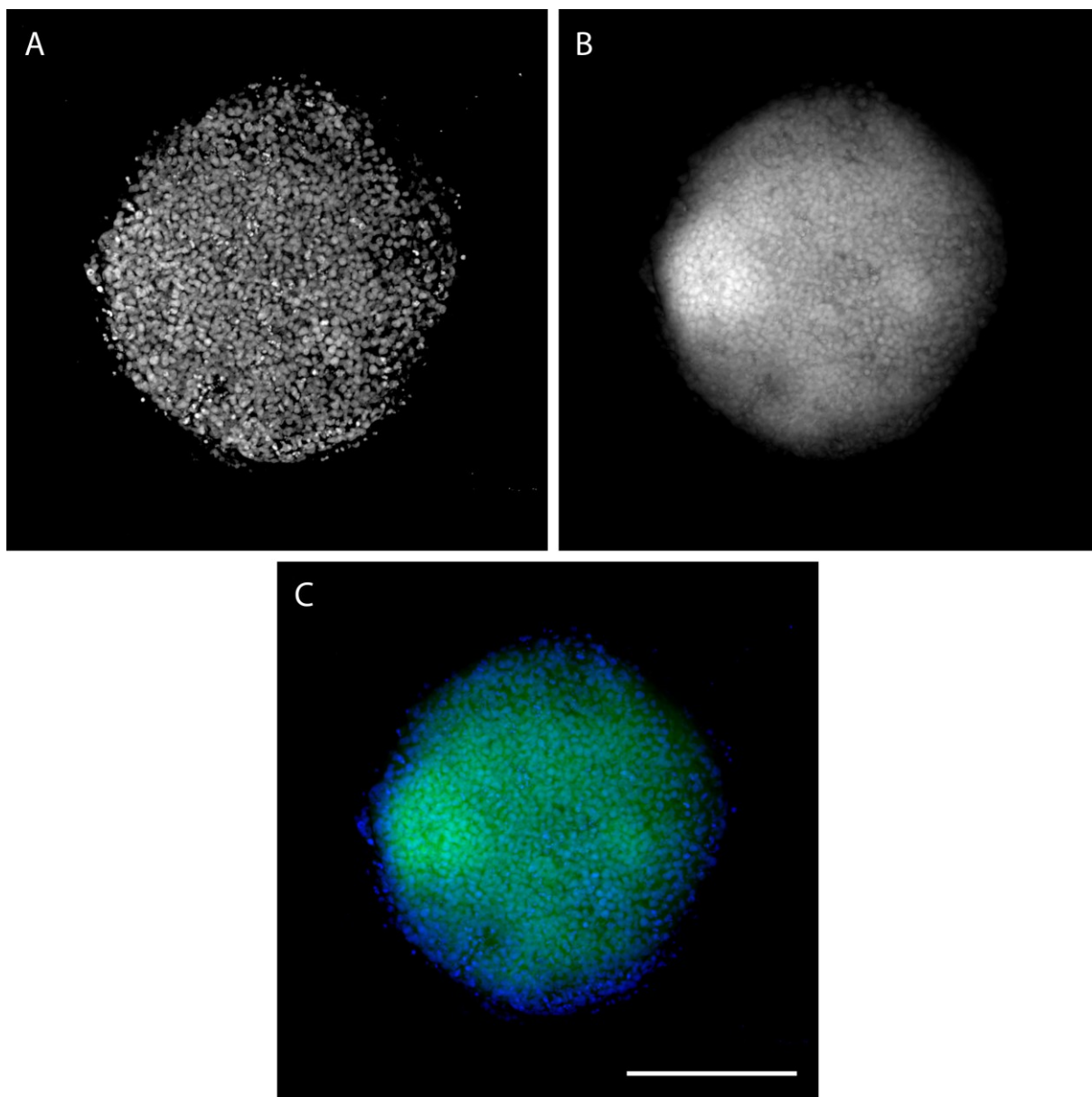
Porovnáním obou obrázků (40 a 41) je vidět, že druhý postup vede k výrazně lepším výsledkům, než postup první. I přes to je potřeba daný postup ještě více optimalizovat. Další optimalizaci této metody a její využití u reálných vzorků po PDT jsme však v rámci této diplomové práce již nestihli.



Obrázek 39. Zobrazení sféroidu fluorescenční mikroskopií. Barvení prvním postupem pomocí fluorescenčních sond Hoechst 33342 (snímek A), Actin Green (snímek B). Snímek C znázorňuje překryv fluorescenčních kanálů (modrá – Hoechst 33342 a zelená – Actin Green).



Obrázek 40. Zobrazení sféroidu konfokální mikroskopií. Barvení prvním postupem pomocí fluorescenčních sond Hoechst 33342 (snímek A), Actin Green (snímek B). Snímek C znázorňuje překryv fluorescenčních kanálů (modrá – Hoechst 33342 a zelená – Actin Green).



Obrázek 41. Zobrazení sféroidu konfokální mikroskopií. Barvení druhým postupem pomocí fluorescenčních sond Hoechst 33342 (snímek A), Actin Green (snímek B). Snímek C znázorňuje překryv fluorescenčních kanálů (modrá – Hoechst 33342 a zelená – Actin Green).

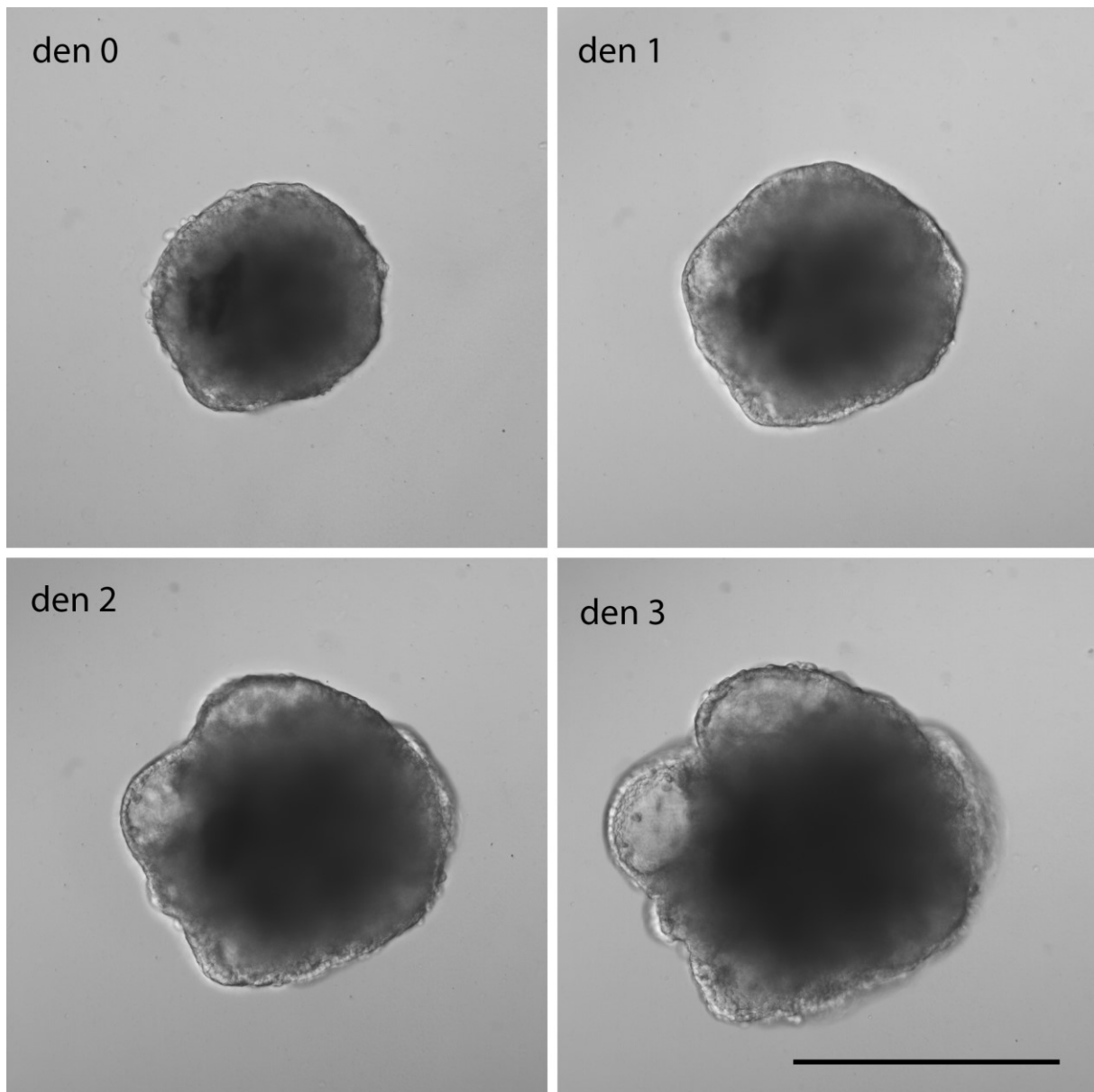
6.10 Invazivní a migrační potenciál sféroidů vytvořených z HeLa buněčné linie

Schopnost invaze a migrace byla zjišťována pomocí 7-denních sféroidů s počáteční koncentrací 500 buněk/jamku vytvořených v ULA destičkách.

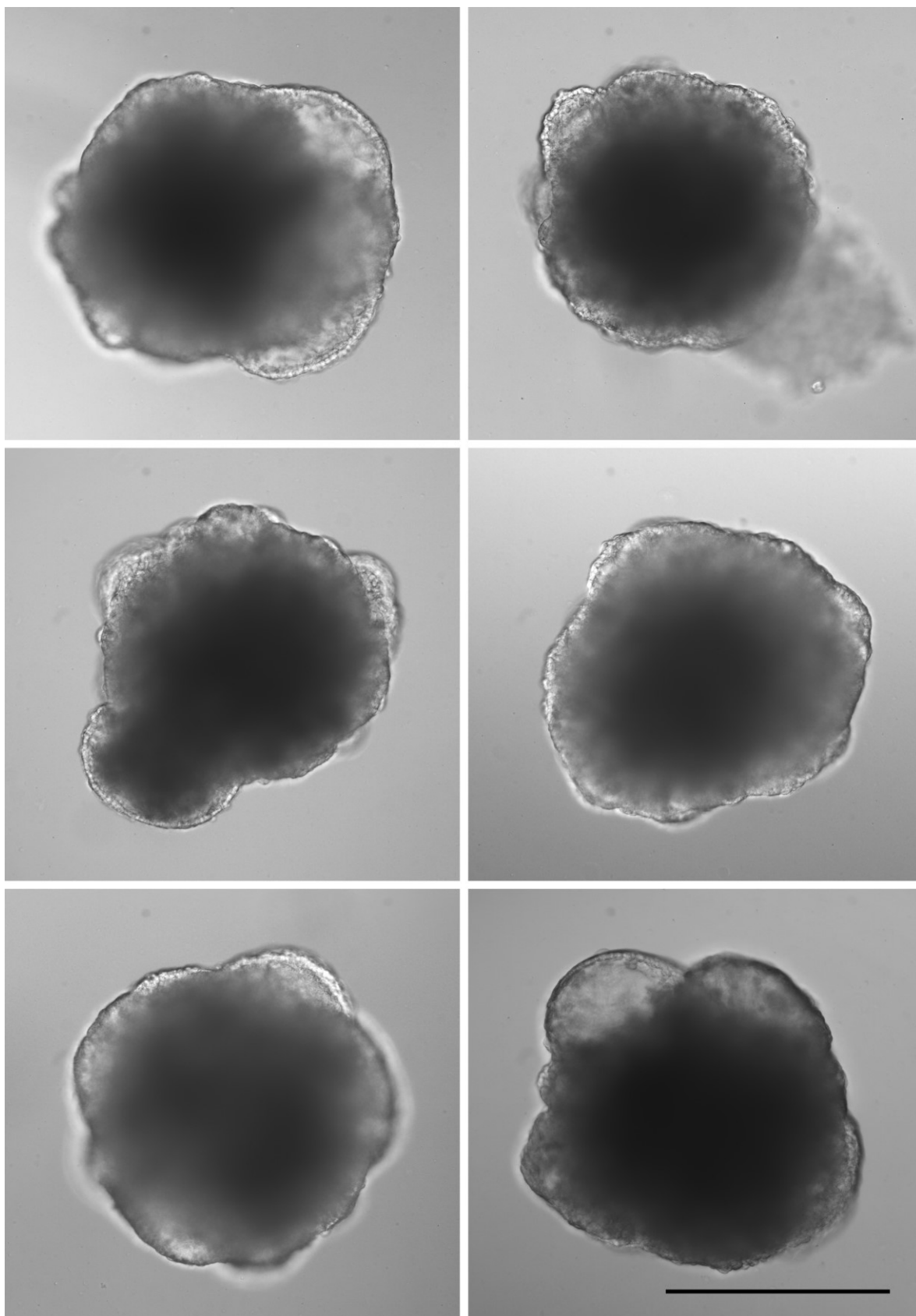
K těmto sféroidům byl v případě testu invaze přidán GeltrexTM, který nahrazoval ECM. Sféroidy zabudované v GeltrexuTM jsme pozorovali během následujících 4 dnů (Obr. 42 a Obr. 43). V našem experimentu jsme zjistili, že sféroidy tvořené buněčnou linií HeLa nevykazovaly invazivní charakter, jelikož nebyla viditelná tvorba invadopodií typických pro invazi do ECM, ale došlo zde pouze k proliferaci buněk – balónovité protruze do okolí. Pokud by šlo o invazi do okolní ECM, bylo by téměř nemožné ji kvantitativně hodnotit, protože tyto protruze vznikají v 3D prostoru náhodně, a ne pravidelně kolem celého sféroidu, jak tomu je u typické radiální paprscité invazivity pozorované u jiných buněčných linií. Jako negativní kontrola nám sloužily sféroidy v SCM (Obr. 44).

Při zjišťování migrace nebyly sféroidy umístěny do gelu, ale byly přeneseny do sterilní mikrotitrační kultivační destičky s plochým dnem, ke kterému jim bylo umožněno přilnout. Již první den jsme mohli zaznamenat tvorbu lamellipodií při jejich rozrůstání po dně jamky v monovrstvě do okolí, které jsme sledovali ještě následující 3 dny (Obr. 45). Sféroidy z buněčné linie HeLa tudíž mají schopnost migrovat.

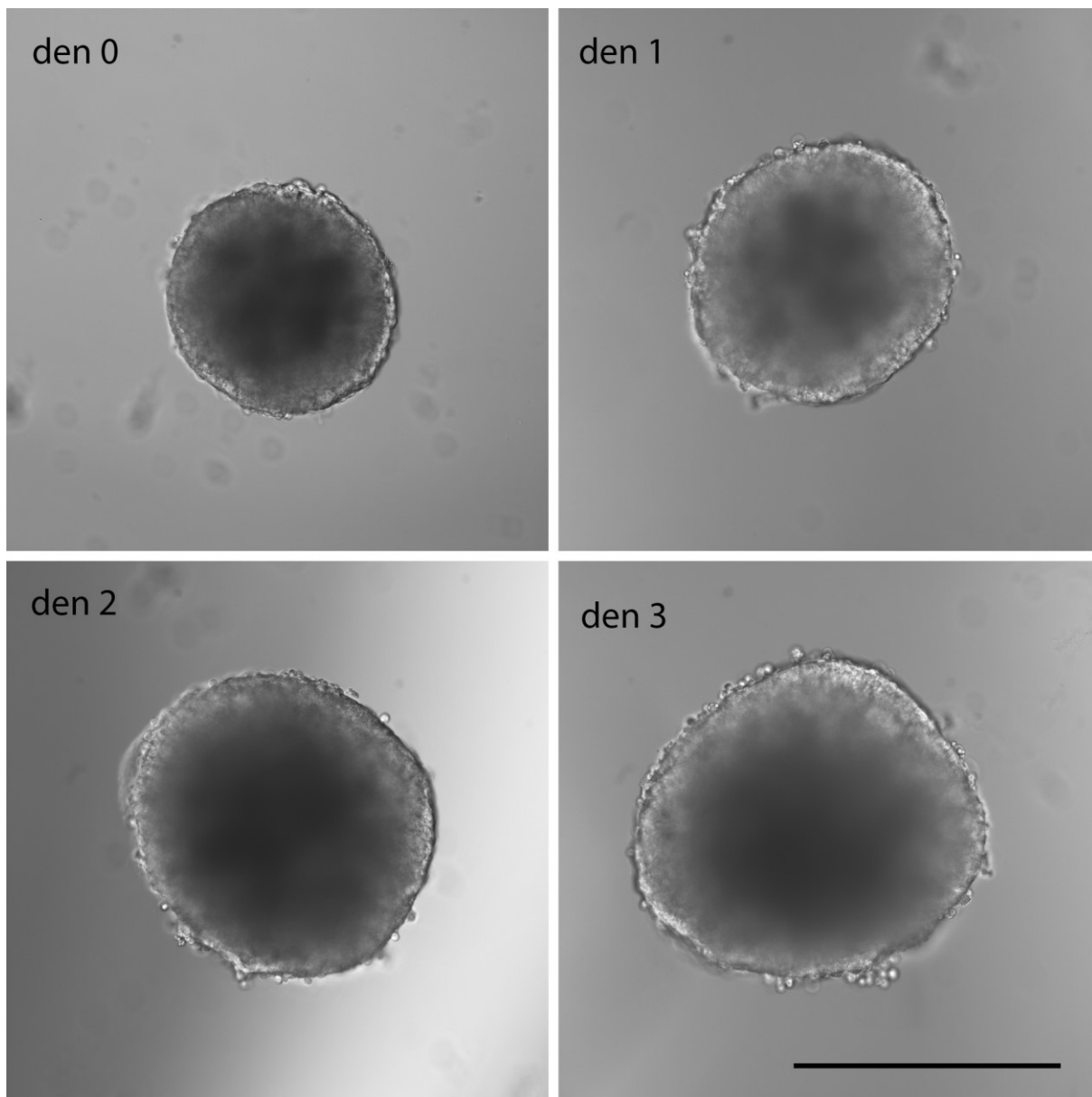
Stejně jako u fluorescenčního barvení, ani zde jsme bohužel tyto metody nestihli aplikovat na vzorky po fotodynamickém působení PS.



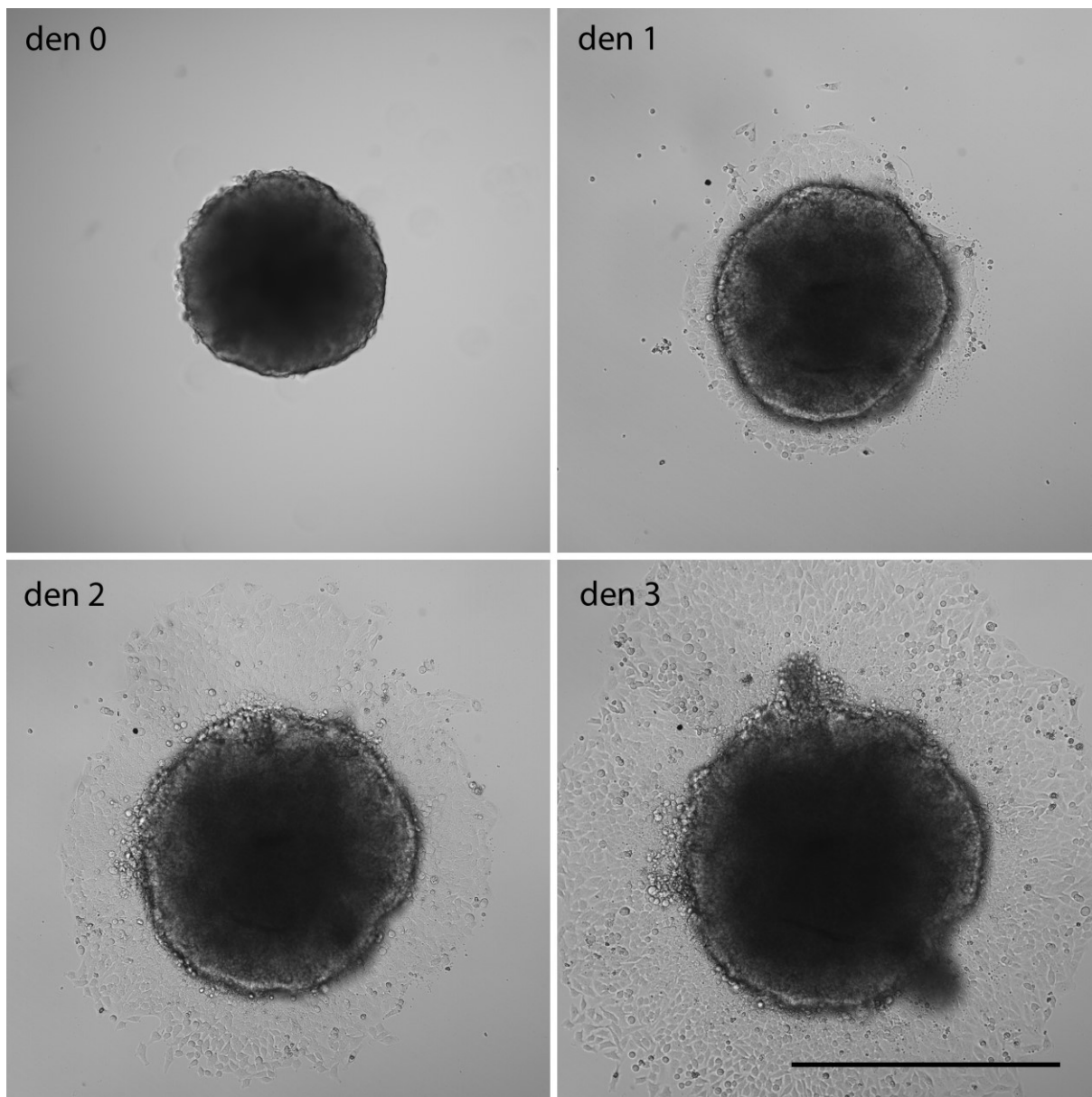
Obrázek 42. Sféroidy tvořené buněčnou linií HeLa zabudované do hydrogelu (GeltrexTM). HeLa buňky netvoří invadopodia a nejsou schopné radiální paprscité invaze do okolní ECM. Na sféroidech je možné pozorovat pouze balónovité protruze do okolí. Měřítka odpovídá 650 μm .



Obrázek 43. Morfologie různých sféroidů tvořených buněčnou linií HeLa zabudovaných do hydrogelu (Geltrex™) ve 4. dni. Měřítka odpovídá 650 μm .



Obrázek 44. Kontrolní sféroidy tvořené buněčnou linií HeLa v médiu. Měřítka odpovídá 650 μm .



Obrázek 45. Migrace Hela buněk ze sféroidu po povrchu kultivačního plastu. Měřítko odpovídá 650 μm .

7 ZÁVĚRY

- Vytvořili jsme sféroidy z buněčné linie HeLa pomocí metod visuté kapky a ULA destiček. Optimální počáteční koncentrace buněk byla pro visutou kapku 250 až 1000 buněk/kapku, pro metodu ULA destičky byla obdobná. Jako ideální se však ukázala počáteční koncentrace 500 buněk/jamku. Vzhledem k jednoduchosti a morfologii sféroidů byla následně pro námi provedené cytotoxicitní testy, testy invaze a migrace a zobrazení konfokální mikroskopií využita metoda ULA destičky.
- Rychlost růstu a velikost sféroidů u obou metod závisela na počáteční koncentraci nasazených buněk. Menší koncentrace vykazovaly stejný lineární růst u obou metod. Metoda visuté kapky však neposkytovala vhodné podmínky pro růst sféroidů s vysokou koncentrací buněk (3000 buněk/kapku). Metoda ULA destičky umožnila v porovnání s visutou kapku tvorbu jednotnějších sféroidů.
- Použití kolagenu při zhotovení sféroidů visutou kapkou neposkytlo v našem experimentu tvorbu kompaktnějších sféroidů.
- Výměna média u sféroidů kultivovaných v ULA destičce neměla na jejich průměr a morfologii vliv.
- Optimální čas inkubace sféroidů s AB byl 4h. Citlivost reagensů AB AB HS a PB se významně nelišila.
- Lepší fotodynamickou aktivitu poskytovala na sféroidech tvořených HeLa buněčnou linií látka P40 s EC_{50} 0,21 μ M ve srovnání s látkou P44, kde hodnota EC_{50} činila 0,67 μ M. Rozdílný zdroj (xenonová lampa, laserová dioda) a síla světelného záření neměli na hodnotu EC_{50} vliv.
- Byl optimalizován postup pro zobrazení sféroidů konfokální mikroskopií.
- U sféroidů z buněčné linie HeLa nebyl prokázán invazivní charakter. Byla však pozorována jejich migrační schopnost.

8 DISKUZE

Nádorová onemocnění představují celosvětový problém, jelikož se po kardiovaskulárních chorobách jedná o druhou nejčastější příčinu úmrtí v rozvinutých zemích a týká se jedinců jakéhokoli věku. Předpokládá se, že jejich výskyt se bude i nadále zvyšovat. Světová zdravotnická organizace například uvádí, že od roku 2018 do roku 2040 se incidence nádorových onemocnění vyšplhá až na 11,5 milionů, což činí přibližně 63,4% nárůst. Nádorová onemocnění tak pravděpodobně převzou prvenství a stanou se nejčastějším důvodem smrti lidí na celém světě (World Health Organization, 2018).

Přestože nejlepší možností, jak s výskytem nádorových onemocnění bojovat, je prevence, zdokonalování léčebných postupů a vyvíjení účinnějších léčiv je stejně tak důležité. Mnoho informací o nádorových buňkách bylo zjištěno zásluhou 2D buněčných kultur. Kultivace nádorových buněk na plochých substrátech však příliš nenapodobuje složitost mikroprostředí nádoru *in vivo*. Buňky ve 2D kultuře bývají často citlivější vůči cytotoxickým látkám a dochází tak ke zkreslení výsledků. Tento fakt podněcoval vývoj nových, lepších 3D modelových systémů, které věrohodněji simulují prostředí nádorů, interakce mezi buňkami a reakce na podněty z okolí. 3D buněčné sféroidy kromě různých zón proliferace buněk rovněž vytváří gradienty živin, růstových faktorů, pH, produktů metabolismu a také kyslíku stejně jako tomu je v solidních nádorech (Sommerová et. al., 2018).

Existuje mnoho možností, kterými se dají sféroidní kultury připravit. My jsme v této práci použili metodu visuté kapky a ULA destiček. Sféroidy ve visuté kapce byly připraveny v klasické 24-jamkové kultivační mikrotitrační destičce, metoda tedy nebyla ve srovnání s ULA destičkou příliš finančně náročná a nevyžadovala využití dalších ani speciálních přístrojů jako je např. centrifuga s rotorem na destičky. Manipulace s destičkou, ve které byly umístěny kapky, však musela být velmi opatrná, jelikož kapky měly tendenci ztrácet svůj typický visutý tvar (s kruhovou plochou přiléhající k plastu) a rozlévat se po víčku mikrotitrační destičky, čímž se stávaly nepravidelné a především mělčí. Nutnost složité manipulace nastala kromě procesu tvorby kapky také při pravidelné fotografické dokumentaci, kdy se víko s kapkami muselo přenést do sterilní mikrotitrační destičky bez pufry, který během inkubace v původní destičce zabraňoval jejich vysychání. Následně došlo k přetočení desky o 180°, čímž bylo umožněno pořizovat snímky. V případě generování sféroidů pomocí ULA destiček byla manipulace velmi jednoduchá, jelikož buněčná suspenze se pipetovala přímo do jamek, které disponují speciálním nepřilnavým povrchem, a je zde

tedy zajištěno vhodné prostředí pro tvorbu sféroidů. V této destičce je také možné přímo provést fotografickou dokumentaci či případné cytotoxické experimenty (Bresciani et al., 2019). Metoda poskytovala téměř 100% úspěšnost, naopak v případě visuté kapky bylo mnohdy nutné přípravu sféroidů na experimenty opakovat, jelikož buňky i při použití stejného postupu místo sféroidu vytvářely pouhé nepravidelné shluky buněk. Domníváme se, že tento jev mohl být způsoben právě častou manipulací, při které mohla být díky reologickým silám narušena tvorba vazeb mezi buňkami. Výhodou ULA destiček bylo taktéž využití všech jamek mikrotitrační destičky, což u metody visuté kapky nebylo možné, jelikož docházelo k úmrtí buněk. Na druhou stranu, sféroidy ve zcela krajních jamkách po obvodu celé ULA destičky vykazovaly odlišnou životaschopnost, pravděpodobně díky vyšší výměně plynů.

Rychlost formování kompaktního sféroidu v buněčné suspenzi byla rovněž u obou metod rozdílná. Protože při využití ULA destiček dochází ihned po nasazení k centrifugaci, je zde výraznější podpora adheze buněk a je tedy umožněn i rychlejší vznik pevného sféroidu. Sféroidy v ULA destičkách měly pravidelný sférický tvar a byly ostřeji ohraničeny v porovnání se sféroidy vytvořenými ve visutých kapkách. Dosažení ostřeji ohraničených sféroidů vytvořených ULA destičkou ve srovnání s visutou kapkou bylo popsáno i ve studii z roku 2019 publikovanou Bresciani et al., při které byly využity buňky linie pNEN (buněčná linie způsobující pankreatický neuroendokrinní novotvar). Tvorba pravidelných sféroidů pomocí ULA destiček je popisována také v dalších publikovaných článcích (Fennema et al., 2013, Vinci et al., 2012)

Velikost, respektive průměr, kterého sféroidy dosáhly, byl závislý na původním počtu nasazených buněk a na čase, po který sféroid rostl. Logicky tedy, čím vyšší počáteční koncentrace buněk byla v suspenzi zvolena, tím větší byly sféroidy v průběhu následujících dvou týdnů, po které jsme je inkubovali. Závislost konečné velikosti sféroidů na inokulační hustotě buněk potvrzuje i studie z roku 2013 provedená Kelmet et al. V případě využití ULA destičky sféroidy vykazovaly lineární růst ve všech koncentracích. U metody visuté kapky jsme mohli pozorovat viditelný pomalejší růst u nejvyšší koncentrace, tedy 3000 buněk/kapku. To bylo pravděpodobně způsobeno nižším množstvím živin v médiu v poměru k množství buněk, jelikož pipetovaný objem buněčné suspenze pro visutou kapku byl pouze 40 μ l. Kvůli omezenému objemu se visutá kapka doporučuje používat spíše pro tvorbu sféroidů s hustotou buněk 50 – 500 buněk/kapku (Gupta et al, 2016). Provádění výměny použitého média ve visuté kapce v běžném uspořádání je totiž náročné a nese s sebou velké riziko nasátí a narušení sféroidu (Brieslin & O'Driscoll, 2013). Naopak množství pipetované

suspenze do ULA destičky činilo 200 μ l, její využití bylo tedy vhodné i pro suspenzi s vysokou hustotou buněk. Výměna média v ULA destičce je méně složitá, avšak v našem pokusu se 7-denními sféroidy s počáteční hustotou 500 buněk/jamku neměla vliv, jelikož velikost sféroidů nebyla výměnou ovlivněná. To činilo ULA destičku jednoduchým nástrojem pro tvorbu sféroidů s vyšší počáteční koncentrací buněk kultivovaných po delší dobu.

Kolagen patří mezi jednu ze složek ECM, která podporuje mimo jiné adhezi a proliferaci nádorových buněk vytvořením tzv. kolagenové sítě (Xu et al., 2019). Přidání kolagenových fibril k buněčné suspenzi by při vytváření sféroidu mělo urychlit jeho formování a zajistit pevnější strukturu. Kuo et al. v roce 2017 využili kolagen při tvorbě sféroidů z buněčných linií MCF-7 a MDA-MB-231, které způsobují nádor prsu. Pro experiment využili závěsné desky, které jsou založené na principu visutých kapek. Kromě klasického polystyrenového povrchu desek použili také desky s povrchem modifikovaným PDMS. Tyto modifikované desky v kombinaci s 0,5% kolagenem umožnily tvorbu kompaktních sféroidů u obou buněčných linií, zatímco u desek s polystyrenovým povrchem došlo ke tvorbě několika agregátů/sféroidů v kapce. To je vysvětlováno tím, že PDMS představuje hydrofóbnější povrch ve srovnání s polystyrenem, a tak je zde možné vytvořit kapky s menším průměrem a více koncentrovanou buněčnou suspenzí (Cavo et al., 2020). My jsme při tvorbě sféroidu z HeLa buněčné linie využili klasické TPP mikrotitrační destičky, které disponují právě povrchem z polystyrenu. Při tvorbě sféroidu jsme zkusili použít kolagen v koncentracích 0,01 %, 0,005 %, 0,0001 % a 0,0005 %. V případě dvou nejvyšších koncentrací nedošlo ke vzniku jednoho sféroidů, ale spíše ke vzniku většího počtu agregátů či malých sféroidů v jedné kapce podobně jako ve výše zmíněné studii. Tuto skutečnost si vysvětlujeme vysokou viskozitou buněčné suspenze, kdy jednotlivé buňky byly zachyceny v kolagenu a nebyly schopné se gravitací dostat na dno kapky. Zbývající koncentrace umožnily vznik sféroidů, avšak jejich velikost ani morfologie se v porovnání s kontrolními sféroidy bez kolagenu nelišila. Dospěli jsme tedy k závěru, že využití kolagenu při tvorbě sféroidů z HeLa buněčné linie pomocí visutých kapek v TPP destičkách s polystyrenovým povrchem nemá velký přínos.

Sféroidy našly své uplatnění také při testování nových fotocitlivých látek v rámci PDT. PDT představuje alternativní a klinicky schválenou metodu léčby nejen nádorových onemocnění. V porovnání s běžně zavedenými metodami terapie malignit jako jsou chemoterapie a radioterapie, představuje PDT minimálně invazivní metodu cílenou přímo na nádorovou tkáň. Kromě fotocitlivých látek, které jsou stále usilovně zkoumány a nově

vyvíjeny, jsou dalšími nezbytnými složkami $^3\text{O}_2$ a světlo. Kombinací těchto komponent dochází po ozáření k fotochemické reakci, při které vznikají ROS, především $^1\text{O}_2$. ROS navozují buněčnou smrt nádorových buněk přímým poškozením, ale vedou také k destrukci cévního zásobení nádoru a stimulaci imunitního systému (Agostinis et al., 2011).

Nejčastěji využívanými PSs jsou porfyriny a jejich deriváty. Do této skupiny spadají také Pcs, které se jeví jako velmi slibné, jelikož silně absorbují při vlnových délkách kolem 700 nm a poskytují dostatečnou tvorbu $^1\text{O}_2$ a dalších ROS. Nevýhodou těchto látek je jejich hydrofobní povaha, díky níž dochází k jejich časté agregaci ve vodném prostředí. Právě agregace PS způsobuje snížení až znemožnění tvorby $^1\text{O}_2$. Řešení tohoto nedostatku spočívá v modifikaci struktury hydrofilními nabitými substituenty, které pomocí elektrostatických odpuzivých sil agregaci zabraňují.

Tato práce se zabývala fotodynamickou aktivitou dvou nových Pc PSs syntetizovaných na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv FaF UK vědeckou skupinou prof. PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. Obě látky jsou amfifilní povahy a obsahují centrálně koordinovaný atom zinku v Pc jádře. Látku P40 díky záměně atomu uhlíku za atom dusíku ve struktuře Pc jádra navíc řadíme mezi AzaPcs. Celkový náboj molekuly P40 je kladný, naproti tomu sloučenina P44 patří mezi anionické látky. Uvádí se, že bez ohledu na podmínky provedených experimentů, poskytují kladně nabitá Pcs vyšší fotodynamickou aktivitu ve srovnání s anionickými Pcs (Kollar et al., 2020).

Nádorová tkáň je charakteristická svou hypoxií způsobenou rychlou proliferací, a tedy omezeným množstvím $^3\text{O}_2$. Právě množství dostupného $^3\text{O}_2$ však ovlivňuje účinnost PDT. Také prostorové uspořádání buněk v nádoru vyžaduje překonání ECM, aby mohla být fotocitlivá látka dostupná i pro hlouběji uložené buňky (Mohammad-Hadi et al., 2018). Kultivace ve 2D kultuře tyto problémy ve srovnání s 3D sféroidními modely nezohledňuje. Testování účinnosti PDT nově syntetizovaných PS by tedy mělo být prováděno přednostně na 3D nádorových modelech pro získání spolehlivějších výsledků. Účinnost PDT s využitím některých ZnPcs ve sféroidních kulturách byla již literaturou pospána. Obvykle je však zdůrazňována skutečnost, že k dosažení EC_{50} je nutné použít mnohonásobně vyšší koncentrace fotocitlivé látky než na stejné buňky kultivované v monovrstvě (Roguin et al., 2019). Velikost sféroidů bývá také klíčovým parametrem. Manoto et al. (2015) ve výzkumu poukázali na výraznější rezistenci na PDT u sféroidů s velikostí 500 μm ve srovnání se sféroidy velkými 200 μm . V našem experimentu byla fotodynamická účinnost daných látek

studována na sféroidech po sedmi dnech inkubace, kdy jejich velikost dosahovala rozměru $440 \pm 11 \mu\text{m}$.

Dosud byla fotodynamická aktivita námi studovaných PSs hodnocena pouze na 2D buněčných kulturách. Jako zdroj světla byla použita xenonová výbojka ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, $11,2 \text{ J/cm}^2$) a ozařování trvalo 15 minut. V případě použití buněk pocházejících z HeLa buněčné linie a kultivovaných v SCM byla hodnota EC_{50} pro látku P40 $0,027 \pm 0,009 \mu\text{M}$, pro látku P44 pak $0,29 \pm 0,078 \mu\text{M}$. Zde si tedy můžeme povšimnout, že kladně nabitý P40 byl účinnější při nižších koncentracích (Kollar et al., 2020).

Při podobných podmínkách v našem experimentu provedeném na sféroidech ($\lambda > 570 \text{ nm}$, $12,4 \text{ mW/cm}^2$, 30 min , $22,4 \text{ J/cm}^2$) činily hodnoty EC_{50} pro P40 $0,21 \mu\text{M}$ a pro P44 $0,66 \mu\text{M}$. Přestože i tady se potvrdilo tvrzení o větší fotodynamické aktivitě kationické látky P40, hodnoty EC_{50} dosahovaly daleko vyšších hodnot (přibližně desetinásobné). Navíc v případě použité koncentrace $5 \mu\text{M}$, nedošlo k vyššímu fototoxickému účinku, ale naopak buňky ve sféroиду vykazovaly vyšší životaschopnost než u nižší použité koncentrace $1 \mu\text{M}$ (P40 56 %, P44 51 %). Proto se zdálo být použití Xe výbojky jako neefektivní a přešli jsme k testování s využitím laserové diody s výrazně vyšší dávkou ozáření (450 J/cm^2 během 5 min ozařování). V případě použití nejvyšší koncentrace látek $5 \mu\text{M}$, došlo k většímu cytotoxickému účinku na buňky než po jejich ozáření Xe výbojkou. U látky P44 životaschopnost buněk klesla dokonce až na 18 %. Hodnota EC_{50} se však pohybovala v podobných koncentracích, konkrétně pro látku P40 $0,28 \mu\text{M}$, pro látku P44 $0,67 \mu\text{M}$. Vyšší dávka ozáření tedy EC_{50} významně neovlivnila.

Rizvi et al. (2013), kteří použili sféroidy z OVCAR5 (buněčná linie lidského karcinomu vaječníku) a verteporfin jako PS, popsali taktéž větší účinek fotodynamické aktivity při využití menší koncentrace fotocitlivé látky $0,25 \mu\text{M}$ v porovnání s koncentrací $10 \mu\text{M}$.

Účinnost nových PSs na sféroidech může být hodnocena také pomocí vizuálního zobrazení fluorescenční či konfokální mikroskopií. V této práci již nebylo možné z časových důvodů tuto metodu aplikovat na sféroidy ovlivněné PSs. Bylo však provedeno optimalizování postupu barvení, který by se v budoucnu v naší vědecké skupině mohl využít.

Byla taktéž využita metoda, při které lze zjistit migrační a invazivní potenciál buněk. Sféroidy tvořené buněčnou linie HeLa nevykazovaly typický obraz invazivity do okolního hydrogelu tvořeného proteiny ECM. To bylo poměrně překvapivé, jelikož buněčná linie HeLa

je odvozená z buněk způsobujících cervikální karcinom, jež je často spjatý s výskytem sekundárních ložisek. U buněk však byla prokázána schopnost migrace. Pomocí stejného testu bylo již popsáno monitorování inhibice invaze sféroidů po jejich ošetření účinnými látkami. Vinci et al. (2012) popsali inhibiční potenciál cytostatika tanespimycinu v různých koncentracích na invazi sféroidů z buněčných linií MDA-MB-231 (buněčná linie karcinomu prsu) a U-87 (buněčná linie glioblastomu). Již po 24 hodinách bylo ve srovnání s kontrolními sféroidy pozorováno zmenšení zóny paprscité radiální invaze do ECM. Metoda by v budoucnu mohla být provedena také u sféroidů ošetřených námi studovanými PSs, čímž by se daly zjistit další informace ohledně potenciálního účinku PSs v *in vivo* prostředí

9 SEZNAM ZKRATEK

$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
$^3\text{O}_2$	molekulární kyslík
AB	AlamarBlue TM
AIDS	syndrom získané imunodeficiencie
ALA	kyselina 5-aminolevulinová
ASC	primární stromální buňky odvozené od tukové tkáně
CYP	enzymy z rodiny cytochromů P450
DIC	diferenciální interferenční kontrast
DILI	léky indukované poškození jater
DMEM	kultivační médium
EC ₅₀	střední efektivní koncentrace
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HeLa	buněčná linie odvozená z lidských buněk karcinomu děložního čípku
HepaRG	buněčná linie lidského cholangiokarcinomu
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HepG2	buněčná linie odvozená od hepatocelulárního karcinomu
HIF-1 α	hypoxií indukovaný faktor alfa
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HpD	hematoporfyrinový derivát
HTS	z angl. „high throughput screening“
Huh-7	buněčná linie odvozená od hepatokarcinomu
IL-24	interleukin 24
LDL	nízkodenzitní lipoprotein

LED	světlo emitující dioda
MCF-7	linie lidských buněk prsního karcinomu
MCTS	mnohobuněčné nádorové sféroidy
MDA-MB-231	buněčná linie odvozená od lidského prsního karcinomu
MDR1	z angl. „MultiDrug Resistance protein 1“
MMP2	mataloproteináza 2
MMP9	matrixová metaloproteinasa 9
MRP2	z angl. „Multidrug Resistance-associated Protein 2“
MSC	mezenchymální kmenové buňky
OVCAR5	buněčná linie lidského karcinomu vaječníku
PB	PrestoBlue™
PBS	fosfátový pufr
Pc	ftalocyanin
PDMS	polydimethylsiloxan
PDT	fotodynamická terapie
PEG	polyethylenglykol
PHH	primární lidské hepatocyty
Poly-HEMA	polyhydroxymethakrylát
PS	fotozenzitizér
RGD (motiv)	arginin-glycin-asparaginový aminokyselinový motiv
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTG	rentgenové záření
SCM	DMEM médium obsahující sérum
U-87	buněčná linie glioblastomu
UGT	uridin 5'-difosfoglukuronosyltransferasa
ULA destičky	destičky s velmi nízkou adhezivitou

10 POUŽITÁ LITERATURA

1. AGOSTINIS, P., BERG, K., CENGEL, K. A., FOSTER, T. H., GIROTTI, A. W., COLLNICK, S. O., HAHN, S. M., HAMBLIN, M. R., JUZENIENE, A., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAH, J., MROZ P., NOWIS, D., PIETTE, J., WILSON, B. C. & GOLAB, J. 2011. Photodynamic therapy of cancer: An update. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61, 250-281.
2. AGOSTINIS, P., BERG, K., CENGEL, K. A., FOSTER, T. H., GIROTTI, A. W., GOLLNICK, S. O., HAHN, S. M., HAMBLIN, M. R., JUZENIENE, A., KESSEL, D., KORBELIK, M., MOAN, J., MROZ, P., NOWIS, D., PIETTE, J., WILSON, B. C. & GOLAB, J. 2011. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61, 250-281.
3. AHMED, S., CHAUHAN, V. M., GHAEMMAGHAMI, A. M., AYLOTT, J. W. 2019. New generation of bioreactors that advance extracellular matrix modelling and tissue engineering. Biotechnology Letters, 41(1), 1-25.
4. ANTONI, D., BURCKEL, H., JOSSET, E. & NOEL G. 2015. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. International Journal of Molecular Sciences, 16(12), 5517-5527.
5. BAKER, B. M. & CHEN, CH. S. 2012. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. Journal of Cell Science, 125(13), 3015-3024.
6. BELL, C. C., HENDRIKS, D. F., MORO, S. M., ELLIS, E., WALSH, J., RENBLUM, A., FREDRIKSSON PUIGVERT, L., DANKERS, A. C., JACOBS, F., SNOEYS, J., SISON-YOUNG, R. L., JENKINS, R. E., NORDLING, A., MKRTCHIAN, S., PARK B. K., KITTERINGHAM, N. R., GOLFRING, C. E., LAUSCHKE, V. M., INGELMAN-SUNDBERG, M. 2016. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease, 6:25187.
7. BERENS, E. B., HOLY, J. M., RIEGEL, A. T. & WELLSTEIN, A. 2015. A Cancer Cell Spheroid Assay to Assess Invasion in a 3D Setting. Journal of Visualized Experiments, (105).

8. BONNIER, F., KEATING, M. E., WRÓBEL, T. B., MAJZNER, K., BARANSKA, M., GARCIA-MUNOZ, A., BLANCO, A. & BYRNE, H. J. 2015. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology in Vitro*, 29(1), 124-131.
9. BRESCIANI, G., HOFLAND, L. J., DOGAN, F., GIAMAS, G., GAGLIANO, T. & ZATELLI, M. CH. 2019. Evaluation of Spheroid 3D Culture Methods to Study a Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cell Line. *Frontiers in Endocrinology*, 10.
10. BRESLIN, S & O'DRISCOLL, L. 2013. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2013, 18(5-6), 240-249.
11. CADDEO, S., BOFFITO M. & SARTORI, S. 2017. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5.
12. CASANO, A. P., DEMIDOVA, T. N. & HAMBLIN, M. R. 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 279-293.
13. CAVO, M., DELLE CAVE, D., D'AMONE, E., GIGLI, G., LONARDO, E. & DEL MERCATO, L. L. 2020. A synergic approach to enhance long-term culture and manipulation of MiaPaCa-2 pancreatic cancer spheroids. *Scientific Reports*, 10(1).
14. CESARZ, Z. & TAMAMA, K. 2016. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 1-11.
15. D'SOUZA, N., ROSSIGNOLI, F., GOLINELLI, G., GRISENDI, G., SPANO, C., CANDINI, O., OSTURU, S., CATANI, F., PAOLUCCI, P., HROWITZ, E. M. & DOMINICI, M. 2015. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Medicine* , 13(1).
16. EDMONDSON, R., BROGLIE, J. J., ADCOCK, A. F. & YANG, J. 2014. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), 207-218.

17. EL-SHERBINY, I. M. & YACOUB, M. H. 2013. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and Practice*, 2013(3).
18. Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, all cancers, both sexes, all ages. World Health Organization [online]. 2018 [cit. 2020-08-01]. Dostupné z: https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-bar?type=0&type_sex=0&mode=population&sex=0&populations=900&cancers=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0&single_unit=500000&print=0
19. FENNEMA, E., RIVRON, N., ROUWKEMA, J., VAN BLITTERSWIJK, C. & DE BOER, J. 2013. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*, 31(2), 108-115.
20. FRIEDL, P. & WOLF, K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 362-374.
21. GUPTA, N., LIU, J. R., PATEL, B., SOLOMON, D. E., VAIDYA, B. & GUPTA, V. 2016. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioengineering & Translational Medicine*, 1(1), 63-81.
22. HAM, S. L., JOSHI, R., THAKURI P. S. & TAVANA, H. 2016. Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery. *Experimental Biology and Medicine*, 241(9), 939-954.
23. HOARAU-VÉCHOT, J., RAFII, A., TOUBOUL, C. & PASQUIER, J. 2018. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1).
24. JAMIESON, L. E., HARRISON D. J. & CAMPBELL, C. J. 2015. Chemical analysis of multicellular tumour spheroids. *The Analyst*, 140(12), 3910-3920.
25. JENSEN, C. & Yong T. 2020. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7.

26. JOLLY, M. K. 2015. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 5.
27. KATT, M. E., PLACONE, A. L., WONG, A. D., XU, Z. S. & SEARSON, P. C. 2016. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4.
28. KELM, J. M., TIMMINS, N. E., BROWN, C. J., FUSSENEGGER, M. & NIELSEN, L. K. 2003. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 173-180.
29. KNIGHT E. & PRZYBORSKI S. 2015. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*, 227(6), 746-756.
30. KOLLAR, J., MACHÁČEK, M., HALAŠKOVÁ, M., LENČO J., KUČERA, R., DEMUTH, J., ROHLÍČKOVÁ, M., MILETÍN, M., NOVÁKOVÁ, V. & ZIMČÍK, P. 2020. Cationic Versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(14).
31. KOPECKÝ, O. & KREJSEK, J. 2004. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus, ISBN 80-86225-50-X.
32. KUO, CH., WANG, J., LIN, Y., WO, A. M., CHEN, B. P. C. & LEE, H. 2017. Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. *Scientific Reports*, 7(1).
33. KWIATKOWSKI, S., KNAP, B., PRZYSTUPSKI, D., SACZKO, J., KĘDZIERSKA, E., KNAP-CZOP, K., KOTLIŃSKA, J., MICHEL, O., KOTOWSKI, K. & KULBACKA, J. 2018. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098-1107.
34. LABARBERA, D. V., REID, B. G. & YOO, B. H. 2012. The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(9), 819-830.

35. LAKSHMINARAYANAN, S. 2018. Micro/Nano Patterning on Polymers Using Soft Lithography Technique. THIRUMALAI, Jagannathan, ed. Micro/Nanolithography - A Heuristic Aspect on the Enduring Technology.
36. Langhans S. A. 2018. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol*, 9.
37. LI, Y. & KUMACHEVA, E. 2018. Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. *Science Advances*, 4(4).
38. LIN, R. Z. & CHANG, H. J. 2008. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9-10), 1172-1184.
39. LUCEY, B. P., NELSON-REES, W. A. & HUTCHINS, G. M. 2009. Henrietta Lacks, HeLa buňky a kontaminace buněčné kultury. *Archivy patologie a laboratorního lékařství*, 133(9), 1463-1467.
40. MAO, A. S. & MOONEY, D. J. 2015. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(47), 14452-14459.
41. MAY, M. 2018. 3D Cell Culture and Analysis: Evolution and Applications.
42. MOHAMMAD- HADI, L., MACROBERT, A. J., LOIZIDOU, M. & YAGHINI E. 2018. Photodynamic therapy in 3D cancer models and the utilisation of nanodelivery systems, 10(4).
43. NAKANISHI, J., TAKARADA, T., YAMAGUCHI, K. & a MAEDA, M. 2008. Recent Advances in Cell Micropatterning Techniques for Bioanalytical and Biomedical Sciences. *Analytical Sciences*, 24(1), 67-72.
44. NATH, S. & DEVI G. R.. 2016. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & Therapeutics* 163, 94-108.
45. ONISZCZUK, A., WOJTUNIK-KULESZA, K. A. & ONISZCZUK, T. a Kamila KASPRZAK. 2016. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 912-929.

46. PETRENKO, Y., SYKOVÁ E. & KUBINOVÁ Š. 2017. The therapeutic potential of three-dimensional multipotent mesenchymal stromal cell spheroids. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1).
47. PETRY, F., WEIDNER, T., CZERMAK, P. & SALZIG, D. 2018. Three-Dimensional Bioreactor Technologies for the Cocultivation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Beta Cells. *Stem Cells International*, 1-14.
48. POVÝŠIL, C. & ŠTEINER I. 2012. *Obecná patologie*. Galén, ISBN 9788072627738.
49. QUIST, A. P. & OSCARSSON, S. 2010. Micropatterned surfaces: techniques and applications in cell biology. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5(6), 569-581.
50. ROGUIN, L. P., CHIARANTE, N., GARCÍA VIOR, M. C. & MARINO J. 2019. Zinc(II) phthalocyanines as photosensitizers for antitumor photodynamic therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 114.
51. SANT, S. & JOHNSTON, P. A. 2017. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 23, 27-36.
52. SERBAN, M. A. & PRESTWICH, G. D. 2008. Modular extracellular matrices: Solutions for the puzzle. *Methods* , 45(1), 93-98.
53. SNYDER, J. E, HAMID, Q., WANG, C., CHANG, R., EMAMI, K., WU, H. & SUN, W. 2011. Bioprinting cell-laden matrigel for radioprotection study of liver by pro-drug conversion in a dual-tissue microfluidic chip. *Biofabrication* , 3(3).
54. SOMMEROVÁ, L., MICHALOVÁ E. & HRSTKA R. 2018. New Approaches for Chemosensitivity Testing in Malignant Diseases. *Klinická Onkologie*, 31(2).
55. STRÍTESKÝ, J. 2001. *Patologie*. Olomouc: Epava, ISBN 978-80-86297-06-4.
56. THAKURI, P. S., LIU, C., LUKER, G. D. & TAVANA, H. 2018. Biomaterials-Based Approaches to Tumor Spheroid and Organoid Modeling. *Advanced Healthcare Materials* , 7(6).
57. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. National Institutes of Health: National institute of biomedical imaging and bioengineering [online]. November

2019, 1-2 [cit. 2020-03-17]. Dostupné z: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>

58. TRUJILLO-DE SANTIAGO, G., FLORES-GARZA, B. G., TAVARES-NEGRETE, J. A., LARA-MAYORGA, I. M., GONZÁLEZ-GAMBOA, I., ZAHNG, Y. S., ROJAS-MARTÍNEZ, A., ORTIZ-LÓPEZ, R. & ÁLVAREZ, M. M. 2019. The Tumor-on-Chip: Recent Advances in the Development of Microfluidic Systems to Recapitulate the Physiology of Solid Tumors. *Materials*, 12(18).
59. UNDERHILL, G. H. & KHETANI, S. R. 2018. Bioengineered Liver Models for Drug Testing and Cell Differentiation Studies. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 5(3), 426-439.
60. VINCI, M., GOWAN, S., BOXALL, F., PATTERSON, L., ZIMMERMAN, M., COURT, W., LOMAS, C., MENDIOLA, M., HARDISSON, D. & ECCIES, S. A. 2012. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology* [online]. 2012, 10(1).
61. WEISWALD, L. B., BELLET, D. & DANGLES-MARIE, V. 2015. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*, 17(1), 1-15.
62. XU, S., XU, H., WANG, W., LI, S., LI, H., LI, T., ZHANG, W., YU, X. & LIU, L. 2019. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *Journal of Translational Medicine*, 17(1).
63. YAMAGUCHI, H. & CONDEELIS J. 2007. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(5), 642-652.
64. ZANONI, M., PICCININI, F., ARIENTI, C., ZAMAGNI, A., SANTI, S., POLICO, R., BEVILACQUA, A. & TESEI, A. 2016. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*, 6(1).
65. ZHANG, J., JIANG, C., FIGUEIRÓ LONGO, J. P., AZEVEDO, R. B., ZHANG, H. & MUEHLMANN, L. 2018. A. An updated overview on the development of new

photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 137-146.

66. ZHOU, Y., SHEN, J. X. & LAUSCHKE, V. M. 2019. Comprehensive Evaluation of Organotypic and Microphysiological Liver Models for Prediction of Drug-Induced Liver Injury. *Frontiers in Pharmacology*, 10.