



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# KOMPLEXY NA BÁZI PŘECHODNÝCH KOVŮ JAKO KANDIDÁTNÍ LÁTKY PRO TERAPII GLIOBLASTOMU A MOZKOVÝCH METASTÁZ

METAL-BASED COMPOUNDS AS POTENTIAL CANDIDATES FOR THE TREATMENT OF GLIOBLASTOMA  
AND BRAIN METASTASES

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Marie Švitelová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Vojtěch Novohradský, Ph.D.

BRNO 2025

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP2064/2024 Akademický rok: 2024/25  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Bc. Marie Švitelová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek  
Vedoucí práce: **Mgr. Vojtěch Novohradský, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Komplexy na bázi přechodných kovů jako kandidátní látky pro terapii glioblastomu a mozkových metastáz

### Zadání diplomové práce:

- Rešerše literatury – orientace v problematice primárních mozkových nádorů včetně metastáz, pochopení základních principů, mechanismů a molekulárně–biologických procesů vedoucích k iniciaci a progresi metastazování nádorových buněk. Současná, v klinice aplikovaná léčba mozkových malignit.
- Zvládnutí kultivačních technologií 2D, 3D a cerebrálních organoidů.
- Studium inhibice modelových mozkových malignit na připravených in vitro modelech po aplikaci vybrané série komplexů na bázi přechodných kovů.
- Příprava in vitro hemato–encefalické bariéry (HEB) a studium průchodu kandidátních látek skrze HEB.
- Predikce/prokázání mechanismu působení studovaných látek.
- Studium průniku studovaných látek do nádorových 3D tkáňových modelů.
- Návrh selektivní metody k efektivnímu potlačení mozkových malignit, eliminace nežádoucích účinků.
- Ucelená interpretace výsledků, hodnocení souvislostí, případných nesrovnalostí a jejich efektivní řešení.

## **Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2025:**

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.  
Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Marie Švitelová  
studentka

Mgr. Vojtěch Novohradský, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## ANOTACE

Cerebrální nádory a jejich protinádorová terapie představuje v současné době velmi aktuální problematiku a jednu z největších výzev onkologie, ve které jsou veškeré nově získané informace velkým přínosem pro společnost. I přes mimořádný rozvoj tohoto oboru se stále řadí nádory mozku mezi nejhůře léčitelné malignity, které účinně odolávají všem dostupným léčebným přístupům. Tato skutečnost motivuje vědecké týmy k nalezení nových a účinnějších terapií. Hlavním cílem této diplomové práce bylo určit potenciálního kandidáta z řady oktaedrických fotoaktivovatelných iridiových komplexů obecného vzorce  $[\text{Ir}(\text{tppy})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{PF}_6$  pro léčbu glioblastomu a navrhnout vhodný terapeutický přístup. Při testování výše zmíněných látek jsme se zaměřili na analýzu anti-proliferačního působení komplexů za využití standartních 2D a 3D *in vitro* systému, ale také komplexnějších modelů pro přesnější odhalení jejich efektivity v organismu pacienta. Z výsledků práce vyplývá, že komplex Ir4 vykazuje výborné terapeutické účinky při aplikaci na sferoidy odvozené z buněk glioblastomu U87MG. Experimenty dále prokázaly, že po fotoaktivaci modrým světlem katalyzuje Ir4 v buňkách glioblastomu zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku, které působí cytotoxicky. Selektivní působení sloučeniny Ir4 bylo stanoveno pomocí fúzních systémů složených z nezhooubných lidských cerebrálních organoidů a sféroidů odvozených z maligních buněk U87MG. Získané informace naznačují, že komplex Ir4 by mohl představovat vhodného kandidáta pro fluorescenčně řízenou fotodynamickou kooperativní resekci glioblastomu, díky jeho výrazné fluorescenci a majoritní akumulaci v nádorové tkáni.

## KLÍČOVÁ SLOVA

cytostatika, glioblastom, reaktivní formy kyslíku, fotodynamická terapie

## **ANNOTATION**

The concern brain tumors and their treatment remains highly relevant today, representing one of the greatest challenges in oncology. Every new piece of knowledge in this field brings significant benefits to society. Despite the extraordinary development of this field, the brain tumors are still among the most challenging malignancies to treat, which has ability to resist almost all available treatments. This motivates research teams to find novel and effective therapy. The main aim of this diploma work was to select a potential candidate of a series of octahedral photoactivatable iridium complexes of general formula  $[\text{Ir}(\text{ttpy})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{PF}_6$  to treat human brain glioblastoma and to design a suitable therapeutic approach. During the research of the above mentioned complexes we focused on the analysis of the antiproliferative activity of these complexes on 2D and 3D *in vitro* models, but we also analyzed the effectivity of Ir(III) complexes on fusion system mimicking the situation in the patient's organism. The results of the work show that the Ir4 complex has high therapeutic effects when it is applied to the spheroids derived from U87MG glioblastoma cells. The experiments also proved that the mechanism of action of this complex after their photoactivation with blue light in glioblastoma cells involves an increased production of reactive oxygen species, which have a cytotoxic effect. The selective action of Ir4 was determined by using fusion systems consisting of non-malignant human cerebral organoids and spheroids derived from malignant U87MG glioblastoma cells. The obtained information suggests that Ir4 could represent a suitable candidate for fluorescently guided photodynamic cooperative resection of glioblastoma due to its pronounced fluorescence and its ability to accumulate in tumor tissue.

## **KEYWORDS**

cytostatics, glioblastoma, reactive oxygen species, photodynamic therapy

ŠVITELOVÁ, Marie. *Komplexy na bázi přechodných kovů jako kandidátní látky pro terapii glioblastomu a mozkových metastáz*. Diplomová práce. Vojtěch NOVOHRADSKÝ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ:

*Ráda bych poděkovala panu Mgr. Vojtěchu Novohradskému, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup, řadu velmi cenných rad a připomínek, které mi během řešení této práce poskytl. Dále bych chtěla poděkovat Oddělení molekulární biofyziky a farmakologie Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně za příjemnou atmosféru na pracovišti a úžasný kolektiv. Děkuji také panu prof. Mgr. Václavu Brázdovi, Ph.D. za pomoc při zpracování formální stránky této práce.*

## Obsah

1	ÚVOD .....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	10
	2.1 Glioblastom .....	10
	2.1.1 Statistika .....	11
	2.1.2 Diagnostika .....	12
	2.1.3 Léčba .....	12
	2.2 Omezení terapie .....	16
	2.2.1 Hematoencefalická bariéra .....	16
	2.2.2 Heterogenita a nádorové mikroprostředí .....	17
	2.2.3 Experimentální modely .....	18
3	CÍLE PRÁCE .....	22
4	MATERIÁLY A METODY .....	23
	4.1 Materiály .....	23
	4.1.1 Chemikálie a biologický materiál .....	23
	4.1.2 Studované iridiové komplexy .....	23
	4.1.3 Buněčné linie .....	25
	4.2 Metody .....	26
	4.2.1 Kryokonzervace a rozmražení buněk .....	26
	4.2.2 2D kultivace a pasážování nádorových buněk .....	29
	4.2.3 3D kultivace .....	31
	4.2.4 Antiproliferační aktivita .....	35
	4.2.5 Monitorování transportu testovaných sloučenin přes hematoencefalickou bariéru .....	37
	4.2.6 Kokultivační model BBB s buňkami U87MG s následnou analýzou buněčné akumulace .....	40
	4.2.7 Distribuce zkoumaných komplexů iridia ve sféroidech glioblastomu U87MG .....	41
	4.2.8 Hodnocení buněčné odpovědi 3D sferoidů na studované komplexy .....	42
	4.2.9 Detekce reaktivních forem kyslíku ve sféroidech U87MG .....	45
	4.2.10 Příprava modelu implantátu sferoid-organoid pro přesnější charakterizaci mechanismu působení Ir <sup>4</sup> komplexu .....	46
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	49
	5.1 Antiproliferativní aktivita .....	49

5.2	Analýza morfologických parametrů sféroidů po aplikaci testovaných sloučenin v kombinaci s fotodynamickou terapií .....	51
5.3	Stanovení metabolické aktivity sféroidů ošetřených zkoumanými komplexy v kombinaci s fotodynamickou terapií .....	54
5.4	Distribuce zkoumaných komplexů iridia ve sféroidech glioblastomu U87MG	58
5.5	Monitorování transportu testovaných sloučenin přes hematoencefalickou bariéru.....	60
5.6	Kokultivační model BBB s buňkami U87MG a následnou analýzou buněčné akumulace .....	62
5.7	Detekce reaktivních forem kyslíku ve sféroidech U87MG .....	63
5.8	Charakterizace mechanismu působení komplexu Ir4 na modelu implantátu sféroid-organoid .....	66
5.8.1	Studium distribuce komplexu Ir4 ve fúzním systému .....	66
5.8.2	Účinky léčby Ir4 v kombinaci s fotodynamickou terapií na modelu implantátu cerebrálního organoid-glioblastom .....	67
5.8.3	Analýza růstu a migrace glioblastomu do zdravé tkáně po aplikované léčbě komplexem Ir4 v kombinaci s ozařováním.....	68
6	ZÁVĚR .....	71
7	REFERENCE .....	73
8	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	91
9	SEZNAM TABULEK.....	93
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	94

## 1 ÚVOD

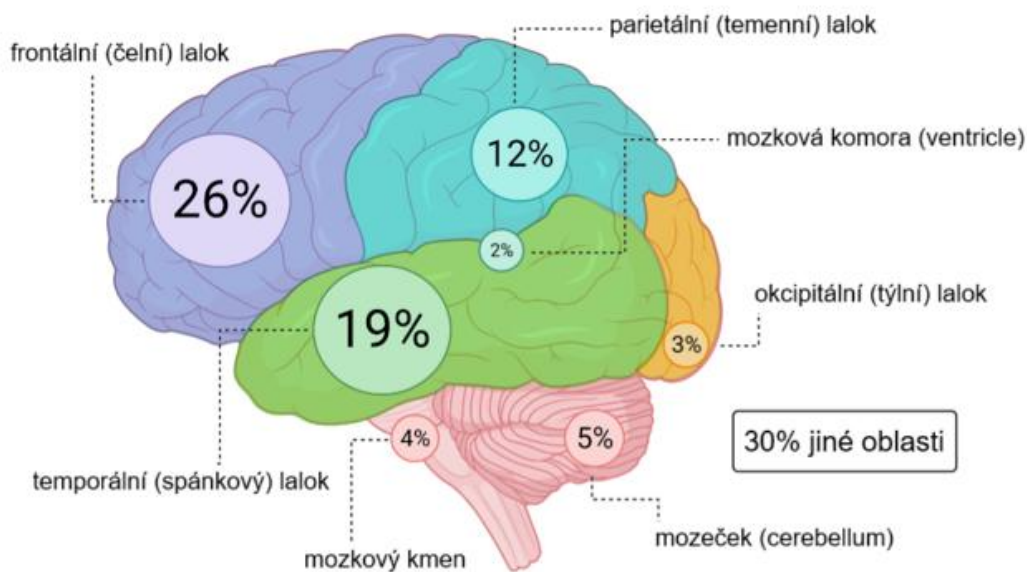
Rakovina patří mezi nejčastější závažná onemocnění současnosti, jejíž incidence stále narůstá [1]. Nádorová onemocnění jsou velmi rozmanitou skupinou chorob, které vznikají ze širokého spektra typů buněk napříč celým tělem a mohou postihnout osoby všech věkových kategorií. Přesný mechanismus vzniku tumorů prozatím není zcela objasněn [2], bylo však prokázáno, že se jedná o multifaktoriální progresivní proces, který může trvat i desítky let, během něhož dochází ke změně genetické informace buněk. Mezi hlavní příčiny přispívající k rozvoji nádorového bujení patří různé fyzikální, chemické a biologické faktory, které působí na lidský organismus po celý život. Dále hrají významnou roli v incidenci rakoviny také vrozené predispozice, věk a životní styl konkrétního jedince [1]. Současné působení více negativních vlivů může vést ke vzniku buněk s charakteristickými změnami v jaderné DNA, které vyvolávají rezistenci buněk vůči apoptóze [3]. Dělením těchto poškozených buněk dochází k šíření chybné genetické informace a vzniku populace abnormálních buněk, které rostou a chovají se nezávisle na kontrolních mechanismech organismu [2].

Termín „cerebrální nádory“ označuje smíšenou skupinu heterogenních novotvarů, z nichž každý má svou vlastní biologii, prognózu a průběh léčby [4]. Tyto malignity patří mezi nejhůře léčitelné rakoviny, které stále představují jednu z největších výzev v onkologii. Standardní léčba rakoviny mozku spočívá v maximální chirurgické resekci s následnou radioterapií a chemoterapií [5]. Konvenční terapeutické přístupy však často nepůsobí na agresivnější typy nádorů, jako je glioblastom [6]. Pro zhoubné nádory mozku v současnosti neexistují jednotně úspěšné léčebné strategie [5]. Z tohoto důvodu byla v posledních letech provedena řada studií, které poskytly velké množství informací o vývoji primárních mozkových nádorů či o souvisejících molekulárních a metabolických změnách. Navzdory rozšíření našeho chápání biologie tohoto onemocnění a vývoji nových terapeutických přístupů se míra přežití pacientů s cerebrálními nádory za poslední desetiletí nezvýšila [5], [6], [7]. Mezi nové přístupy patří například imunoterapie [6], [8] nebo cílená chemoterapie mozkových nádorů, využívající fotoaktivovatelná protinádorová chemoterapeutika [9]. Fotodynamická chemoterapie představuje potencionální budoucí nadějnou léčbu nádorů lidského mozku, která by selektivně cílila na nádor a vykazovala méně nežádoucích účinků, minimální invazivitu a menší toxicitu na organismus pacienta. Tento slibný terapeutický přístup ovšem musí v praxi překonat několik problémů a omezení, jako je komplikovaná heterogenita nádoru, mikroprostředí lidského mozku a samotného nádoru, hematoencefalická bariéra a nedostatek spolehlivých modelů pro testování nových terapií [10], [11].

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Glioblastom

Glioblastom je nejčastější, nejagresivnější a nejsmrtelnější maligní nádor centrální nervové soustavy, který je kategorizován dle histologické klasifikace malignit Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jako gliom IV. stupně [5]. Tento tumor se téměř výhradně vyskytuje v mozkových hemisférách, a to nejčastěji ve frontálním laloku. Přibližně 50 % glioblastomů postihuje zároveň více laloků jedné hemisféry nebo jsou bilaterální [12], [13]. Pouze zřídka se tato malignita objevuje v mozečku (cerebellum), mozkovém kmeni nebo míše (Obrázek 1) [14], [15].



Obrázek 1: Schéma procentuálního zastoupení a lokalizace glioblastomu v mozku. Převzato a upraveno z [16].

Glioblastomy jsou heterogenní nádory, které se vyvíjejí převážně z maligně transformovaných astrocytů [17], které obklopují, podporují a chrání neurony v mozku [18]. Glioblastomy se v současné době rozdělují dle jejich mechanismu vzniku na primární a sekundární. Většina případů (90 %) glioblastomů tvoří primární nádory, které se vyvíjejí „de novo“ z gliových buněk během několika měsíců. Tyto tumory vznikají bez klinických i histologických známek prekursorové léze a častěji postihují starší pacienty s věkem nad 50 let. Sekundární glioblastomy tvoří zbývajících 10 % případů, které se pomalu vyvíjí z již existujících gliomů nižšího stupně malignity, nejčastěji z astrocytomů nebo oligodendrogliomů II. nebo III. stupně, během několika let (nejčastěji 4-5 let). Tento typ nádoru častěji postihuje mladší pacienty [19], [20]. Oba typy tumoru od sebe histologicky téměř nelze odlišit, rozdíly jsou patrné až při genetické a epigenetické analýze. Pro sekundární nádory je charakteristická přítomnost mutace v genu isocitrátdehydrogenasy 1 (IDH1). Tato alterace je obvykle přítomná zejména u sekundárních glioblastomů, zatímco u primárních glioblastomů se vyskytuje pouze v 5–10 % případů. V roce 2016 představila WHO nový klasifikační systém tohoto nádoru založený na stavu mutace genu IDH1, který rozlišuje tři podtypy glioblastomů:

glioblastom IDH „wild type“ (primární glioblastomy), nádory s IDH mutací (sekundární glioblastomy) a glioblastomy NOS (jinak nespecifikováno). Do podtypu NOS se řadí malignity, u kterých nebylo možné určit status mutace IDH z důvodu nedostatku histologického nebo molekulárního materiálu pro testování. V posledních letech byla přidána ještě čtvrtá skupina, a to glioblastom NEC (jinde neklasifikovaný), do které se zařazují nádory nezapadající do žádné z dříve uvedených kategorií klasifikace WHO. Tato situace může nastat, pokud existují nesrovnalosti mezi klinickými, histologickými, imunohistologickými a genetickými charakteristikami tumoru nebo v případě, že existuje glioblastom s neznámou kombinací znaků [15], [21].

### 2.1.1 Statistika

Nádorové onemocnění mozku a centrálního nervového systému (CNS) představuje zásadní onkologický problémem, jehož incidence i mortalita v posledních letech neustále stoupá [22]. V celosvětovém žebříčku incidence nádorů zaujímá karcinom CNS devatenácté místo a v případě mortality se řadí na místo dvanácté [23]. Glioblastom patří mezi jedny z nejčastějších a nejletálnějších primárních maligních nádorů CNS [24]. Jehož incidence tvoří více než 16 % všech nově diagnostikovaných intrakraniálních tumorů CNS a přibližně 50–60 % všech gliomů u dospělých pacientů [17]. Přestože je incidence tohoto karcinomu poměrně nízká a pohybuje se v rozmezí 2-5 lidí na 100 000 jedinců za rok [20]. Statistiky naznačují, že tato malignita se většinou vyskytuje více ve vyspělých západních zemích v porovnání s rozvojovými oblastmi, což může být zapříčiněno omezeným přístupem ke zdravotní péči nebo odlišnostmi v diagnostických postupech [25]. Ze statistik dále vyplývá, že glioblastom se častěji vyskytuje u mužů než u žen (poměru 1,6:1) [14], přičemž frekvence primárního glioblastomu je vyšší u mužů a sekundární typ je hojněji zastoupen u žen [26]. Tato choroba postihuje všechny věkové skupiny, přičemž její četnost plynule stoupá do 70 až 84 let věku [21]. Nejčastěji je diagnostikována u starších pacientů ve věkovém rozmezí 55–64 let [27]. Prevalence glioblastomu je u dětských pacientů velmi nízká [26].

Glioblastom je velice závažné onemocnění s velmi špatnou prognózou, která říká že průměrná doba přežití léčeného pacienta je přibližně 15 měsíců [20] a pouze 5 % nemocných pacientů se dožije pěti let od stanovení diagnózy, přičemž většina se nedožije ani dvou let [17], [22], [24]. Přestože bylo za posledních 20 let dosaženo velkého pokroku v porozumění genomiky a molekulární biologie glioblastomu a bylo vynaložené velké úsilí pro nalezení nových diagnostických a terapeutických přístupů, nedošlo k zásadnímu zlepšení prognózy pacientů [21]. Vysoká mortalita tohoto karcinomu je způsobena především biologickým chováním novotvaru (rychlým růstem a vysokou invazivitou), jeho inter- i intra-tumorovou heterogenitou a omezenou účinností jednotlivých léčebných modalit [10], [11], [28]. Dále závisí také na lokalizaci, velikosti nádoru, fyziologickém stavu a věku pacienta v době diagnózy. Věk hraje velkou roli v délce života pacienta po provedení zákroku, kdy obecně s rostoucím věkem klesá doba přežití, a zatímco se přibližně 66 % pacientů mladších 40 let dožije až 18 měsíců, stejné doby se dožije méně než 10 % osob starších 60 let [29]. Mortalitu tohoto tumoru také zvyšuje skutečnost, že přestože je k dispozici několik nových terapeutických přístupů, v klinické praxi se stále standardně využívá velmi radikální chirurgický zákrok spolu s adjuvantní chemoterapií a radioterapií [22]. Bohužel i po podstoupení této agresivní

multimodální léčby se u přibližně 90 % pacientů, kteří tuto úspěšnou operaci podstoupí, znovu vyvine lokální recidiva [11], [14]. Pro zlepšení prognózy tohoto onemocnění je tedy zásadní vyvinout nové a účinnější terapeutické přístupy.

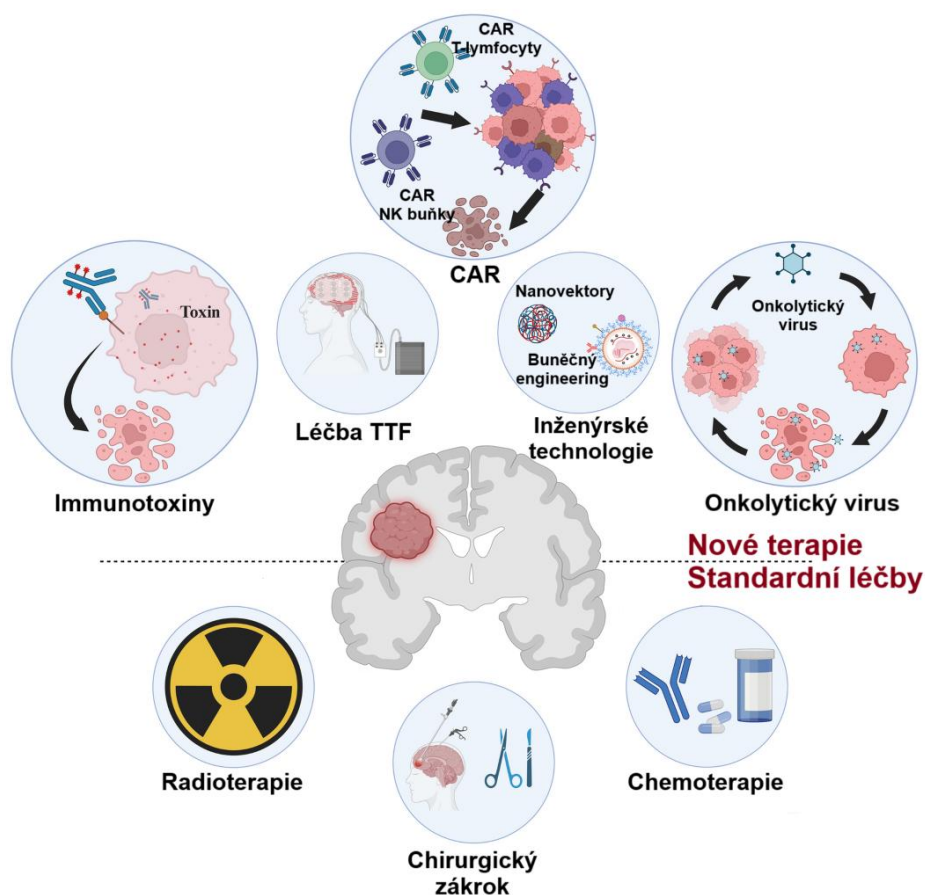
### **2.1.2 Diagnostika**

Diagnostika cerebrálních karcinomů je náročnější a problematictější než u ostatních nádorů. Stěžuje ji nejen lokalizace samotného orgánu, kdy přítomnost hematoencefalické bariéry značně omezuje průstup kontrastních látek do mozku [30], ale také velmi nespecifické počáteční symptomy, jako jsou bolest hlavy, zmatenost, ztráta paměti, potíže s rovnováhou nebo koordinací, změny osobnosti či epileptické záchvaty. Díky širokému spektru symptomů existuje velké množství odpovídajících neurologických stavů, které je třeba odlišit a vyloučit. Z tohoto důvodu je většina glioblastomů diagnostikována až po nástupu vážnějších příznaků. Po projevení příznaků odpovídajících nádoru na mozku je zdravotnickým personálem provedena diagnóza složená většinou z kombinace více metod, která zaručí přesné určení rozsahu nádoru, vyloučí nebo potvrdí přítomnost metastáz a navrhne vhodnou léčbu pacienta [21].

V současně době představují nejdůležitější přínos v diagnostice glioblastomu zobrazovací metody, které umožňují odhalit a sledovat tumor v těle pacienta [30]. Mezi nejpoužívanější metody se řadí počítačová tomografie (CT) a skenovací magnetická rezonance (MRI) [21]. MRI je preferovaná diagnostická modalita, která poskytuje velmi podrobné skeny, jejíž rozlišení se může zlepšit podáním kontrastní látky pacientovi. Ke zvýšení kontrastu mezi nádorem a mozkiem se standardně využívají radioaktivní kontrastní látky, jako je kyselina 68Ga-diethylentriaminpentaoctová [14], 99mTc-technecistan a fluorothymidin používané v kombinaci s narušenou hematoencefalickou bariérou (BBB), nebo nově značené aminokyseliny, které jsou přenášeny přes BBB specifickými transportéry [8]. Pokud pacient nemůže z nějakých důvodů, jako např. kovových implantátů, kardiostimulátorů nebo klaustrofobie, podstoupit MRI vyšetření upřednostní se CT, přestože má nižší tkáňové rozlišení [27]. Pokud zobrazovací metody odhalí podezřelý nález, jsou následně provedeny histologická vyšetření (biopsie) a genetické testy [30]. Po určení co nejpřesnější polohy, rozsahu a stanovení klinického stádia nádoru je lékaři určen terapeutický postup pro daného pacienta.

### **2.1.3 Léčba**

Po provedení všech nezbytných vyšetření je stanoven léčebný postup pro daného pacienta. Při rozhodování o typu terapie záleží především na biologickém chování tumoru, rozsahu malignity, jeho lokalizaci v mozku, celkovém stavu a věku pacienta. Cílem léčby je především úplné odstranění nebo výrazné zmenšení hmoty nádorů, prodloužení a zlepšení kvality života pacienta [31]. Mezi možné konvenční léčebné přístupy používané při terapii glioblastomů patří chirurgický zákrok, radioterapie a chemoterapie (Obrázek 2) [27].



Obrázek 2: Grafický přehled standardních a nových terapeutických přístupů glioblastomu. Převzato a upraveno z [22], [32], [33].

V současné době konvenční léčba glioblastomu zahrnuje maximální chirurgickou resekci tumoru s následnou adjuvantní radioterapií a chemoterapií. Principem chirurgického zákroku je co nejpřesnější odstranění celé nebo radikální části nádorové tkáně bez poškození nenádorových a funkčně důležitých oblastí mozku [27]. Před samotnou kraniotomií (otevření lebky) a operací je nutné na základě diagnostiky upřesnit, jakým způsobem bude cytoredukce provedena (klasicky nebo za využití laseru) [34]. Chirurg může k vedení operace pro získání lepších výsledků použít speciální intraoperační techniky diferencující nádor, jako jsou peroperační ultrazvuk, MRI, CT, stereotaxe nebo fluorescenční zobrazení pomocí kyseliny 5-aminolevulové, fluoresceinu či indocyaninu green, nebo mapování mozku (traktografie nebo funkční magnetická rezonance) [8], [34], [35]. I přes vykonání tohoto vysoce radikálního výkonu je prakticky nemožné odstranit 100 % nádorové tkáně, a to i v případě snadno dostupných tumorů. Tento fakt je způsobem především velmi častými nálezy infiltrovaných nádorových buněk lokalizovaných 2-3 cm od viditelné hranice nádoru, které způsobují opětovnou progresi nemoci či vedou k recidivě [27]. I když se nejedná o resekci kurativního charakteru, má pozitivní vliv na prognózu pacienta a odstraňuje nebo alespoň zmírňuje symptomy onemocnění (snížení intrakraniálního tlaku). Ovšem u velké skupiny pacientů s cerebrálními nádory nelze resekční výkon provést, a to především kvůli rozsahu nebo anatomické lokalizaci maligní léze. Pokud se karcinom nachází ve funkčně zásadních oblastech, jako je elokventní kortex a bazální ganglia, nebo v blízkosti mozkového kmene,

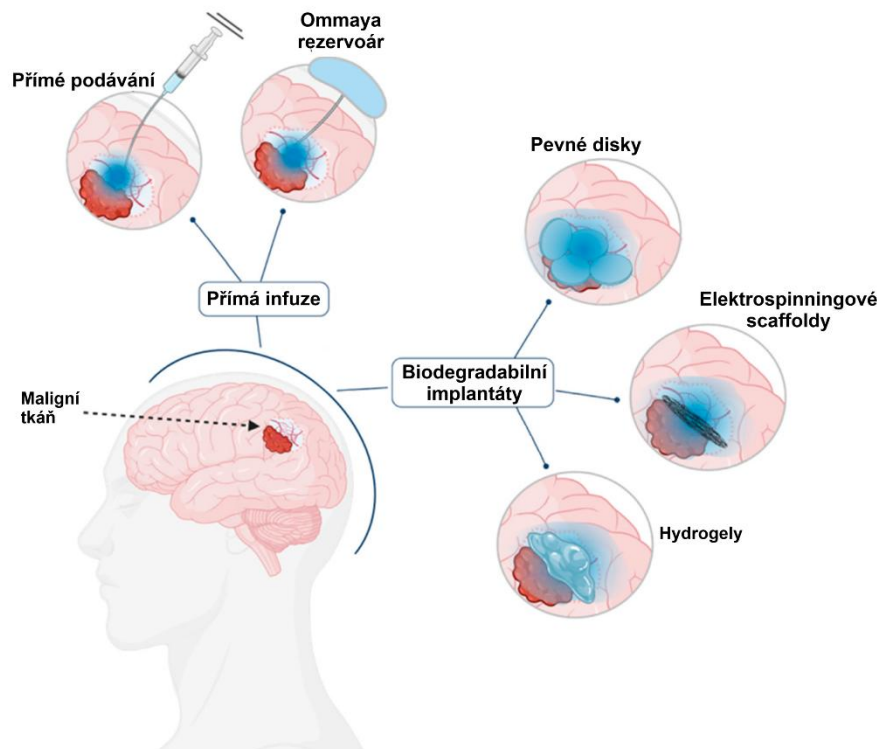
může být indikována alespoň stereotaktická biopsie, během níž je biopsií jehlou za lokální anestezie odebrána část nálezu [27]. Tento zákrok je vykonáván především za účelem přesnější laboratorní diagnostiky. U pacientů starších 70 let, s horším klinickým stavem nebo u níž je biopsie zatížena vysokým rizikem morbidit a mortality se přistupuje k méně invazivním léčbám (samotná radioterapie nebo chemoterapie, nebo jejich sekvenční podání).

Další metodou je radioterapie, která k cytoredukci nádorových buněk využívá ionizující záření (rentgenový paprsek, gama fotony nebo protony) [36]. Radioterapie hraje velmi důležitou roli nejen v komplexní onkologické léčbě glioblastomů, kdy navazuje na neurochirurgický výkon, ale představuje také první volbu u inoperabilních nádorů. Při léčbě této diagnózy může být využito intraoperační (brachyterapie) [27] nebo častěji frakcionované zevní ozáření [27], [37]. V případě glioblastomu se doporučuje aplikovat celkovou dávku v rozmezí 54–60 Grayů (Gy) ve frakcích po 1,8–2 Gy/den, 5 dní v týdnu [14]. Mezi standardně používané pokročilé radioterapeutické techniky patří 3D-konformní radioterapie (3D-CRT) a radioterapie s modulovanou intenzitou svazku (tzv. IMRT a VMAT). Tyto zákroky využívají navádění pomocí zobrazovacích metod k přesnému ozáření nádorových buněk, což umožňuje nejen modifikovat trojrozměrný tvar cílové ozařované oblasti (3D-CRT), ale také upravovat intenzitu aplikovaného záření (IMAT) [8], [36], [38]. Speciálním typem radioterapie je stereotaktická radioterapie, radiochirurgie [38] a terapie protonovým paprskem (PBT) [8], které ozáří přesně definovaný trojrozměrný cíl výrazně vyšší dávkou záření, čímž se minimalizuje množství aplikovaných frakcí a nežádoucí účinky [38]. Pacienti s vyšším věkem (nad 70 let) nebo s horším zdravotním stavem, kteří by mohli standardní léčbu hůře snášet, podstupují zkrácené radioterapeutické režimy (3,0-3,5 Gy/10 frakcí) [39], [40]. Mladším pacientům (věk  $\leq 70$ ) v dobrém klinickém stavu je většinou indikována standardní léčba, složená z radioterapie a perorálně aplikované konkomitantní chemoterapie temozolomidem (TMZ) o denní dávce 75 mg/m<sup>2</sup> [14].

Chemoterapie používá při léčbě nádorů chemické látky (cytostatika), které působí různými mechanismy na tumor a vedou ke zpomalení růstu, zastavení dělení nebo k smrti buněk. Jedná se bohužel o systémovou metodu, která nepůsobí jen na nádorové buňky, ale ovlivňuje i ostatní buňky [8]. Působí tak velké množství závažných vedlejších účinků na organismus pacienta (nauzea, změna krevního obrazu nebo gastrointestinální problémy) [5].

Postavení chemoterapie v léčbě glioblastomů bylo po dlouhou dobu velmi kontroverzní, a to především z důvodu zaznamenání pouze zanedbatelného prodloužení doby přežití pacientů. K definitivnímu potvrzení účinnosti chemoterapie v kombinaci s neurochirurgickým zákrokem a/nebo radioterapií došlo až v roce 2005 v publikované studii profesora Stuppa [14]. Cytostatika se mohou podávat samostatně, nebo častěji v kombinaci s jiným typem léčby [8]. Tyto léky lze pacientovi aplikovat systémově (intravenózně, orálně) [38] nebo lokálně, injekčně přímo do léze [8] či chirurgicky umístěny do nádoru ve formě biodegradabilních polymerních implantátů (Obrázek 3) [37], [41]. Výběr vhodného cytostatika nebo kombinace více zákroků se odvíjí od diagnózy, rozsahu postižení, stádia onemocnění a celkového zdravotního stavu pacienta [8]. V současné době patří mezi schválená cytostatika americkým Úřadem pro kontrolu

potravin a léčiv (FDA) pro léčbu glioblastomu temozolomid (Temodar), bevacizumab (Avastin) a karmustin (Bicnu) [31].



Obrázek 3: Různé možnosti podání léčiv pacientovi při terapii glioblastomu. Převzato a upraveno z [42].

Temozolomid (3,4-dihydro-3-methyl-4-oxoimidazol; TMZ) se řadí do druhé generace alkylačních chemoterapeutik využívaných v protinádorové terapii cerebrálních malignit [43]. Aplikuje se nejčastěji konkomitantně s radioterapií po neurochirurgické resekci nádoru v šesti cyklech ( $75 \text{ mg/m}^2$ ) s následnou adjuvantní chemoterapií, při které je TMZ podáván ve vyšších dávkách ( $150\text{--}200 \text{ mg/m}^2$ ) bez ozáření [36]. Stabilita TMZ v kyselém prostředí ( $\text{pH} < 5$ ) umožňuje jeho orální podání s následnou absorpcí v gastrointestinálním traktu. Po přestupu do neutrálního nebo slabě zásaditého prostředí je molekula TMZ labilní a dochází k její spontánní hydrolyze za vzniku velmi reaktivního kationtu (methyldiazoniový kationt), který interaguje s nukleofilními centry purinových bází DNA. K metylaci dochází v pozicích N7-guaninu (70%), N3-adeninu (9%) a O6-guaninu (6%). Hlavní cytotoxický účinek TMZ je způsoben především metylací O6-guaninu [43]. Methylaci DNA dochází k vnesení chyb do templátu při replikaci, inhibici reparačních mechanismů DNA a zastavení buněčného cyklu (G2-M), což vede ke smrti buňky [27]. Byly také nalezeny důkazy naznačující korelaci mezi metylačními mutacemi promotoru proteinu methylguaninmethyltransferázy (MGMT), zásadního pro opravu DNA, se zvýšenou dobou přežití pacienta. Posouzení stavu MGMT představuje pozitivní prognostický ukazatel pro chemoterapie TMZ u nově diagnostikovaných pacientů [38], [43]. I přes příznivou terapeutickou úspěšnost působí TMZ mnoho závažných vedlejších účinků na organismus pacienta, jako je hematologická toxicita a trombocytopenie (hlášené u 10-20% pacientů) a efektivně léčí pouze malé procento případů glioblastomu [36]. Bohužel u více než 50% pacientů s glioblastomem nevykazuje TMZ aktivitu. Využití TMZ

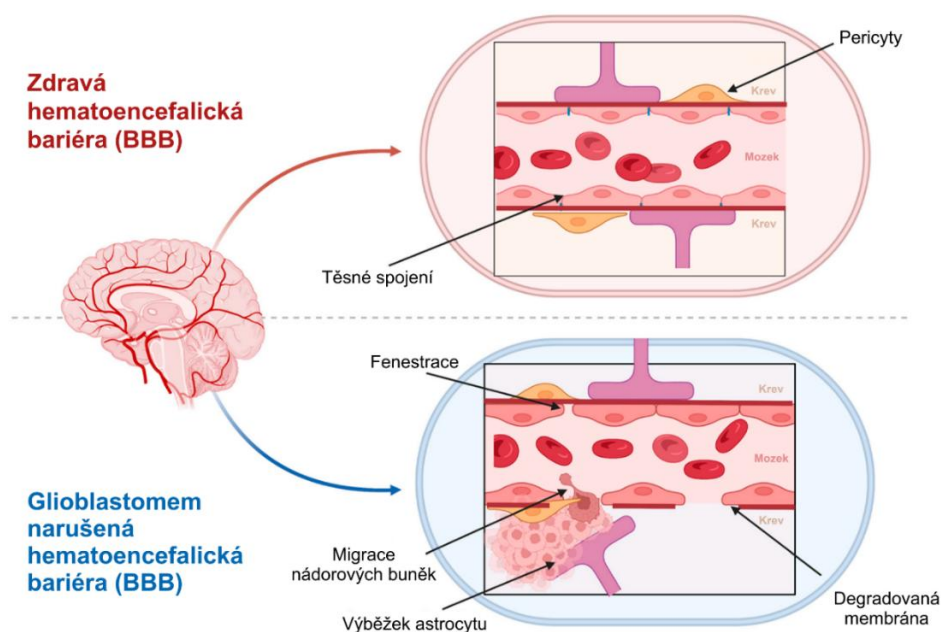
je dále omezeno přirozenou nebo získanou rezistencí nádorových buněk k tomuto léčivu, což zásadně ovlivňuje výslednou úspěšnost terapie [37]. Tato omezení se stala impulzem k podrobnějšímu studiu buněčné biologie nádoru a jeho metabolických pochodů. Získané vědecké poznatky pak umožňují vývoj inovativních a účinnějších terapeutických metod nebo efektivnějších sloučenin působící minimální vedlejší účinky.

## 2.2 Omezení terapie

Přestože je v současnosti stále publikováno mnoho neuro-onkologických článků, navrhuji inovativní terapeutické strategie, se i tyto nové přístupy potýkají s několika zásadními výzvami, které ovlivňují konečnou účinnost aplikované léčby a přispívají k rozvoji rezistence nádoru vůči terapii [21]. Mezi nejzásadnější omezení léčby glioblastomu patří především jeho genetická variabilita a intratumorová heterogenita, různorodé mikroprostředí okolní cerebrální tkáně i samotného nádoru a nutnost překonat hematoencefalickou bariéru (BBB) pro dodání léku do nádorové léze [28].

### 2.2.1 Hematoencefalická bariéra

První překážkou pro podání léčiva při terapii jakéhokoliv onemocnění mozku představuje hematoencefalická bariéra (BBB; blood-brain barrier), která odděluje mozek od krevního oběhu. Tato dynamická struktura je z krevní strany mozkových kapilár tvořena souvislou monovrstvou endotelových buněk spojených těsnými kontakty, která je přes bazální membránu propojena s vrstvou výběžků astrocytů a pericytů z mozkové strany [6]. Tato specializovaná bariéra selektivně reguluje molekulární transport do centrálního nervového systému, udržuje jeho homeostázu a efektivně zabraňuje prostupu vysokomolekulárních a většiny nízkomolekulárních terapeutických činidel do mozku [5]. V případě glioblastomu velmi často dochází z důvodu zvýšené vaskularity a přítomnosti zánětu k lokálnímu narušení BBB (Obrázek 4), přesto si obvykle BBB zachovává svou funkčnost a brání průchodu terapeutické látky [44].



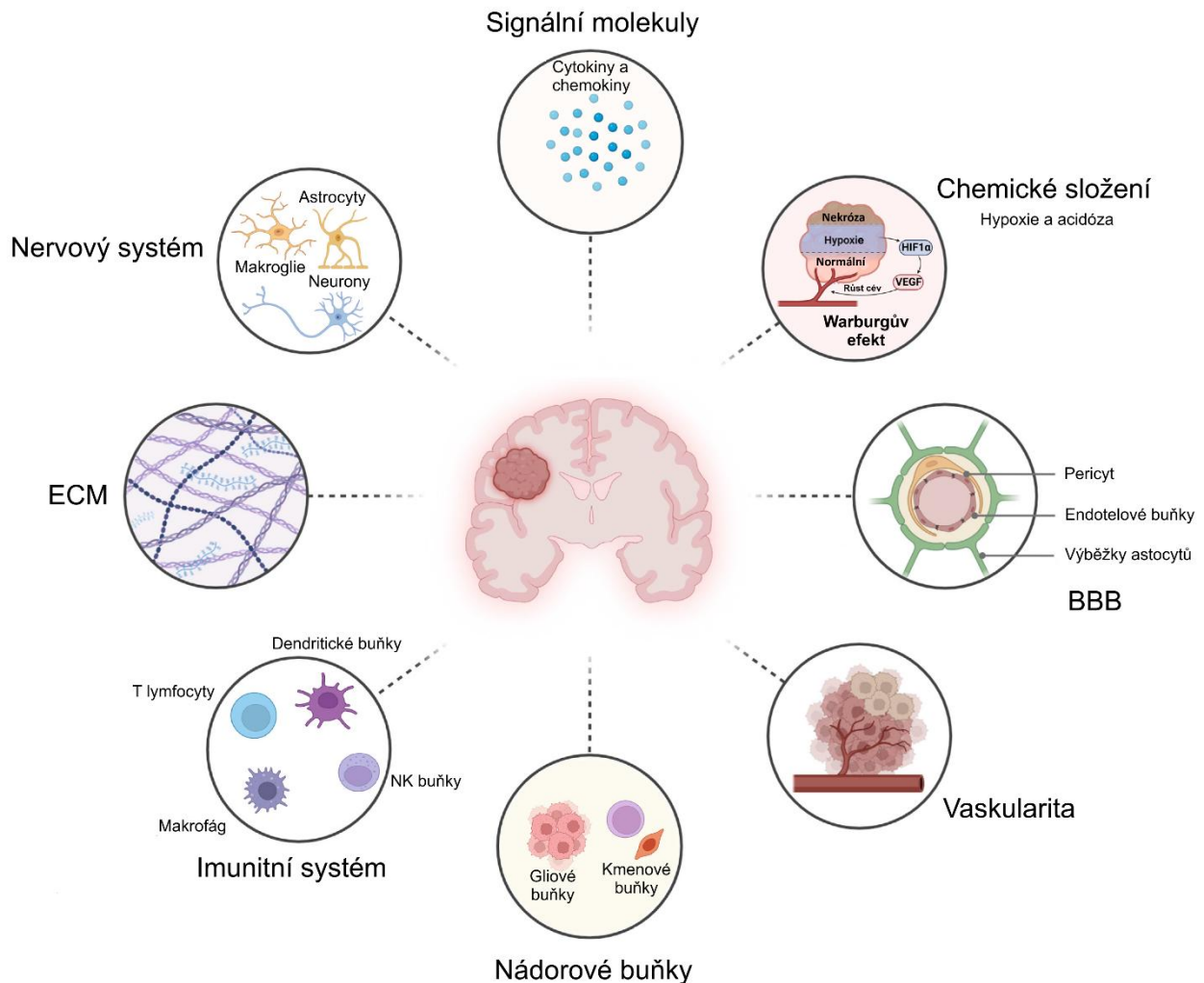
Obrázek 4: Znázornění zdravé a porušené BBB glioblastomu. Převzato a upraveno z [36].

Na základě četných studií byla odhalena síť kvantitativních vztahů určujících na základě fyzikálně-chemických vlastností léčiv pravděpodobnost jejich úspěšné pasivní difuze přes BBB. Mezi ideální charakteristiky léčiv obecně patří vysoká lipofilita a molekulová hmotnost menší než 400-500 Da, záleží ale i na dalších strukturních rysech terapeutické látky [5]. Tyto parametry splňuje bohužel velmi omezené spektrum chemoterapeutik pro mozkové nádory. Pro překonání zmíněných problémů bylo vytvořeno několik přístupů zvyšujících efektivitu aplikované léčby. Prvním způsobem překonání BBB je podání léku do mozku intrakraniální injekcí, kterou se podává chemoterapeutikum přímo do mozkomíšního moku v komoře pomocí chirurgicky dříve zavedené intraventrikulární (nitrokomorové) katétry [8], nebo umístění chemoterapeutických (karmustin) implantátů přímo do místa po resekci nádoru [5]. Další přístup dodání terapeutik obsahuje přechodné narušení hematoencefalické bariéry pomocí fokusovaného ultrazvuku [35], modulace elektrického pole nebo stereotaktické radiační terapie [8], [45]. Nový a inovativní způsob představuje podávání léků na bázi nanočástic, které přenášejí a dodávají nanoenkapsulované léčivo do cílového ložiska. Aplikace nanoléčiv má v porovnání s konvenčním systémem podávání léků mnoho výhod, mezi které patří cílené dodávání léčiva, zlepšená biologická dostupnost, prodloužená cirkulace v krevním řečišti, řízené uvolňování léků a snížená toxicita [8]. Dosud bylo hodnoceno několik různých typů nanonosičů pro léčbu glioblastomu lišících se fyzikálně-chemickými a povrchovými vlastnostmi, jako nanočástice na bázi lipidů, polymerní nebo anorganické nanočástice. Nejčastěji se jako nosiče léčiv využívají lipozomy, které jsou složeny z fosfolipidů a mohou enkapsulovat hydrofilní, hydrofobní i lipofilní léky. Navzdory mnoha preklinickým studiím neexistují prozatím žádná nanoterapeutika schválená FDA pro léčbu pacientů s glioblastomem [46]. V současné době je několik cytotoxických lipozomálních léků určených pro terapii mozkových nádorů v různých fázích klinického testování, jako je zapouzdřený temozolomid [5], doxorubicin [46], 5-fluorouracil nebo paclitaxel [5].

### **2.2.2 Heterogenita a nádorové mikroprostředí**

Další komplikaci při léčbě glioblastomu představuje nejen jeho intratumorová heterogenita, způsobená odlišnou diferenciací nebo dělením buněk různého molekulárního a genetického profilu [36], ale také jeho vysoce heterogenní a komplexní nádorové mikroprostředí (TME) [47]. TME představuje dynamický a strukturovaný systém složený z maligních buněk obklopených širokou škálou nenádorových buněk, včetně různých infiltrujících i rezidentních imunitních buněk (makrofágy, lymfocyty) [11] a buněk původního nervového systému (astrocyty, mikroglie, neurony), začleněných do modifikované a silně vaskularizované extracelulární matrice (ECM) (Obrázek 5) [48]. Tyto buňky tvoří samostatné subpopulace, tzv. nádorové niky, v rozdílných anatomických oblastech nádoru [6]. Veškeré buňky glioblastomu mohou vzájemně v rámci ECM interagovat prostřednictvím přímého buněčného kontaktu nebo parakrinní signalizace prostřednictvím signálních molekul (cytokinů, chemokinů, růstových faktorů nebo enzymů remodelujících matrici) [47]. Glioblastomové buňky zaujímají ústřední roli v této komunikační síti a regulují funkce buněčných i nebuněčných složek TME, což umožňuje modulovat imunitní systém a vytvořit imunosupresivní TME [47], [48], stejně jako změnit složení a zastoupení komponent ECM [49], [50]. Přeprogramované TME zvyšuje stupeň imunosuprese a podporuje rychlou proliferaci, invazi a migraci těchto nádorů, čímž se stupňuje jejich odolnost vůči terapii [47]. V případě

glioblastomu většinou dochází ke zvýšené sekreci kyseliny hyaluronové a fibronektinu, které zlepšují mobilitu a invazivitu gliomových buněk, dále pak kolagenu a trombospondinu [44]. Remodelace ECM (tuhnutí) může také omezit difúzi aplikovaných léků nádorem a snížit účinnost léčby [36].



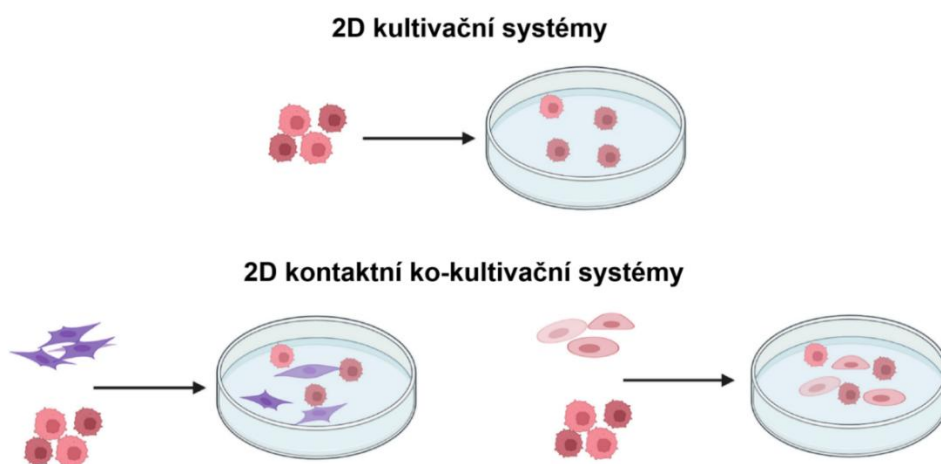
Obrázek 5: Schematické znázornění základních složek mikroprostředí glioblastomu. Převzato a upraveno z [47], [51], [52].

### 2.2.3 Experimentální modely

Bez ohledu na rozsáhlé informace získané o glioblastomu, řady nově identifikovaných slibných terapeutických strategií a dostupnosti konvenčních terapeutických možností, stále nedochází k podstatnému poklesu úmrtnosti pacientů. Omezený pokrok dosažený v léčbě mozkových nádorů částečně souvisí s využíváním preklinických modelů, které neodrážejí adekvátně klinicky zásadní rysy (BBB, heterogenitu, komplexnost TME) nádorů [6]. Mnohé z těchto modelů nedokážou přesně předpovědět účinnost testovaných činidel s terapeutickou aktivitou v organismu pacienta. Z tohoto důvodu mnoho potencionálních terapeutických přístupů působilo pouze omezenou účinností nebo zcela selhalo ve fázi klinického hodnocení [53]. Neschopnost vyvinout efektivnější terapie, které by významně zlepšily míru přežití pacientů, zdůrazňuje nutnost dalšího vývoje přesnějších a předvídatelnějších experimentálních

modelových systémů a naléhavost přehodnocení současných modelů. Bylo by vhodné stanovit minimální charakteristiky modelových standardů, které by umožnily lepší srovnání výsledků různých preklinických studií. Dále je důležité zmínit, že přestože pacienti s glioblastomem jsou léčeni komplexní multimodální terapií, na modelových systémech jsou obvykle testovány pouze monoterapie, které jsou jen zřídka srovnatelné s podmínkami standardní péče [6].

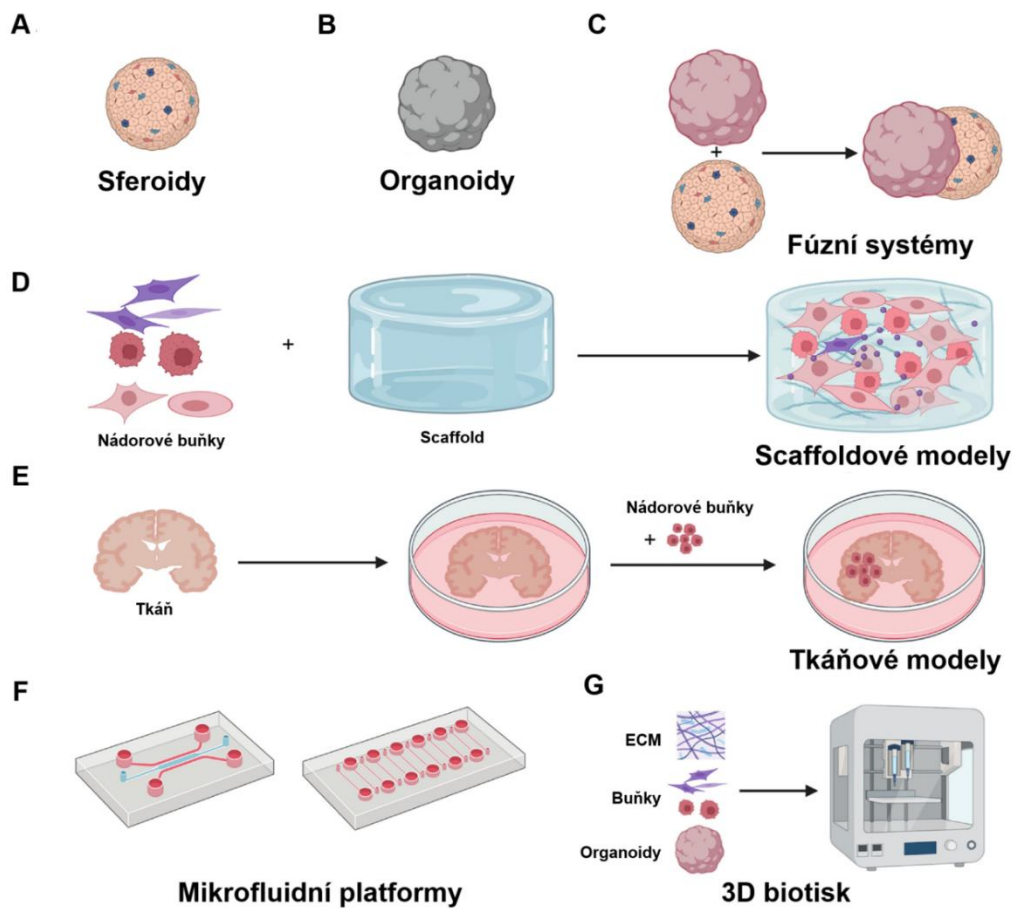
Ideální experimentální modely by měly obsahovat shodné genetické aberace, podobnou intratumorovou heterogenitu a adekvátní nádorové mikroprostředí lidského glioblastomu, které jsou reprodukovatelné a stabilní v průběhu času [53], [54]. Pro studium základních biologických mechanismů glioblastomu a stanovení účinnosti léků je v současné době k dispozici mnoho různých typů *in vivo* a *in vitro* modelů. Nejrozšířenější screeningovou techniku využívanou především při počátečním hodnocení a selektování potenciálních terapeutik představují 2D buněčné kultury [55]. 2D kultivační systémy umožňují rozmnožení a kultivaci různých buněčných linií za účelem jejich kryokonzervace nebo přípravy složitějších 2D ko-kultivačních modelů pro zkoumání vzájemných přímých či nepřímých interakcí (Obrázek 6) [56]. Tato metoda bohužel nedokáže napodobit mnoho charakteristik *in vivo* TME [57]. Zároveň vykazuje fenotypový a genotypový drift [10], který po opakovaném pasážování omezuje další využití těchto kultur a ovlivňuje buněčný metabolismus, signalizace a odpověď na léčbu [56].



Obrázek 6: Schématické znázornění různých typů 2D kultivačních systémů. Převzato a upraveno z [56].

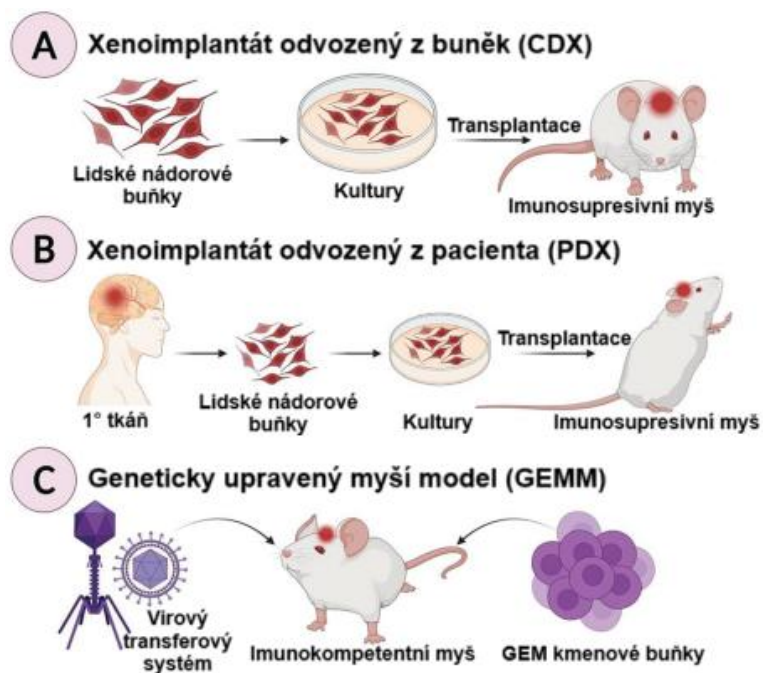
Z tohoto důvodu byly vytvořeny různé trojrozměrné buněčné systémy, jako jsou sferoidy, organoidy, mikrofluidní platformy (organ-on-a-chip) a 3D biotisk (Obrázek 7) [56], [58], [59]. Ačkoliv tradiční *in vitro* kultivační systémy využívají pouze jednotlivé typy buněk, mohou do určité míry modelovat progresi nádoru a jeho reakci na terapii. Naproti tomu mnohobuněčné 3D ko-kultivační systémy poskytují spolehlivější nástroj, ve kterém koexistují různé typy buněk a vytvářejí komplexní síť lépe rekapitulující *in vivo* TME [60], umožňující studium komplexnějších buněčných interakcí [56]. Dále se tyto modely používají ke zkoumání vývoje a progresu nádoru, zároveň usnadňují screening potenciálních kandidátů na léčiva [61], [62]. Ovšem současné 3D ko-kultivační *in vitro* systémy umožňují napodobit pouze omezenou heterogenitu a složitost TME glioblastomu pacientů [56].

## 3D kultivační systémy



Obrázek 7: Přehled využívaných 3D modelů. Převzato a upraveno z [56].

Pro přesnější studium těchto charakteristik se využívají různé *in vivo* modely, které zahrnují xenoinplantáty (založené na buněčné linii nebo odvozené od pacienta; PDX) [6], syngenní modely a různé druhy geneticky upravených imunodeficientních a imunokompetentních zvířat (nejčastěji hlodavci, např. geneticky upravené myši GEMM) (Obrázek 8) [54]. Tyto technologie mají zachované buněčné složení nádoru (PDX), umožňují analyzovat mechanismy tumorigeneze a biologie nádorů ve fyziologickém kontextu (GEMM). *In vivo* systémy představují nejbližší modely reálnému onemocnění. Jejich významnou slabinu ovšem představuje oslabení imunity hostitele (závisí na použitém kmenu myši), která neumožňuje zkoumat zcela zásadní reakci mezi nádorem a imunitním systémem [28]. V současnosti stále reprezentuje nejideálnější způsob testování nových léčebných přístupů kombinace *in vivo* a *in vitro* modelů [54].



Obrázek 8: Zvířecí *in vivo* modely glioblastomu. Převzato a upraveno z [63].

Pro nalezení kurativní terapie glioblastomu a překlenutí propasti mezi pozitivními výsledky preklinických studií a selháním v klinické fázi testování je nezbytný další výzkum a zdokonalení využívaných experimentálních modelů [53]. Tyto důvody vedou vědecké pracovníky k identifikaci nových přístupů s vyšší účinností, sníženou toxicitou a nevyvolávající rezistenci u pacientů s glioblastomem.

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo stanovit efektivitu komplexů na bázi přechodných kovů a odhalit mechanismus jejich vlivu při terapii glioblastomu.

Náš projekt si klade za úkol tyto konkrétní dílčí cíle:

- stanovit antiproliferační aktivitu studovaných sloučenin v 2D i 3D podmínkách,
- monitorovat změny morfologických parametrů připravených 3D modelů mozkových malignit po aplikaci testovaných komplexů,
- studovat distribuci zkoumaných sloučenin ve 3D nádorových modelech,
- monitorovat průchod vybraných látek přes model hemato-encefalické bariéry,
- potvrdit tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) v nádorových modelech po aplikaci testovaných látek,
- charakterizovat mechanismus působení kandidátních komplexů na fúzní model implantátu sféroid-organoid.

## 4 MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Materiály

#### 4.1.1 Chemikálie a biologický materiál

Etanol ( $\geq 99\%$ ), dimetylsulfoxid (DMSO), kyselina octová (99%), kyselina trichloroctová ( $\geq 99\%$ ), tris a sulforhodamin B (SRB) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich s.r.o., Praha, Česká republika.

Epidermální růstový faktor (EGF), fibroblastový růstový faktor (FGF2) a hovězí sérový albumin (BSA) byly pořízeny od společnosti Sigma Aldrich, Německo.

Fetální bovinní sérum (FBS; 5%), epidermální růstový faktor (hEGF), fibroblastový růstový faktor (hFGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (hVEGF), rekombinantní růstový faktor lidského inzulínu (R3-IGF-1), kyselina askorbová, hydrokortison, směs gentamicin/amfotericin (GA-1000) byly pořízeny od společnosti Lonza, Švýcarsko.

Gentamycin a HCl (pro měření na ICP-MS) byl zakoupen od firmy Merck, Česká republika.

B27, Geltrex, RevitaCell™ Supplementu (podpora rozmražení), roztok VERSENE, trypsin, roztok kolagenu typu I, Kalcein AM, Hoechst 33258, propidium jodid a CellRox Green® (oxidative stress green reagent) byly zakoupeny u firmy Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA.

CellTiter-Glo® 3D Reagent byl pořízen u Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA.

Fetální bovinní sérum (FBS) a fosfátový pufr (PBS) byly pořízeny od firmy PAA, Pasching, Rakousko.

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), CellRecovery® a matrice Matrigel byly získány od společnosti Corning, New York, USA.

Rock inhibitor (Y-27632; Dihydrochloride) a temozolomid (TMZ) byly zakoupeny od společnosti Selleckchem, Frankfurt nad Mohanem, Německo.

Trypsin-EDTA byl získán od společnosti Biosera, Cholet, Francie.

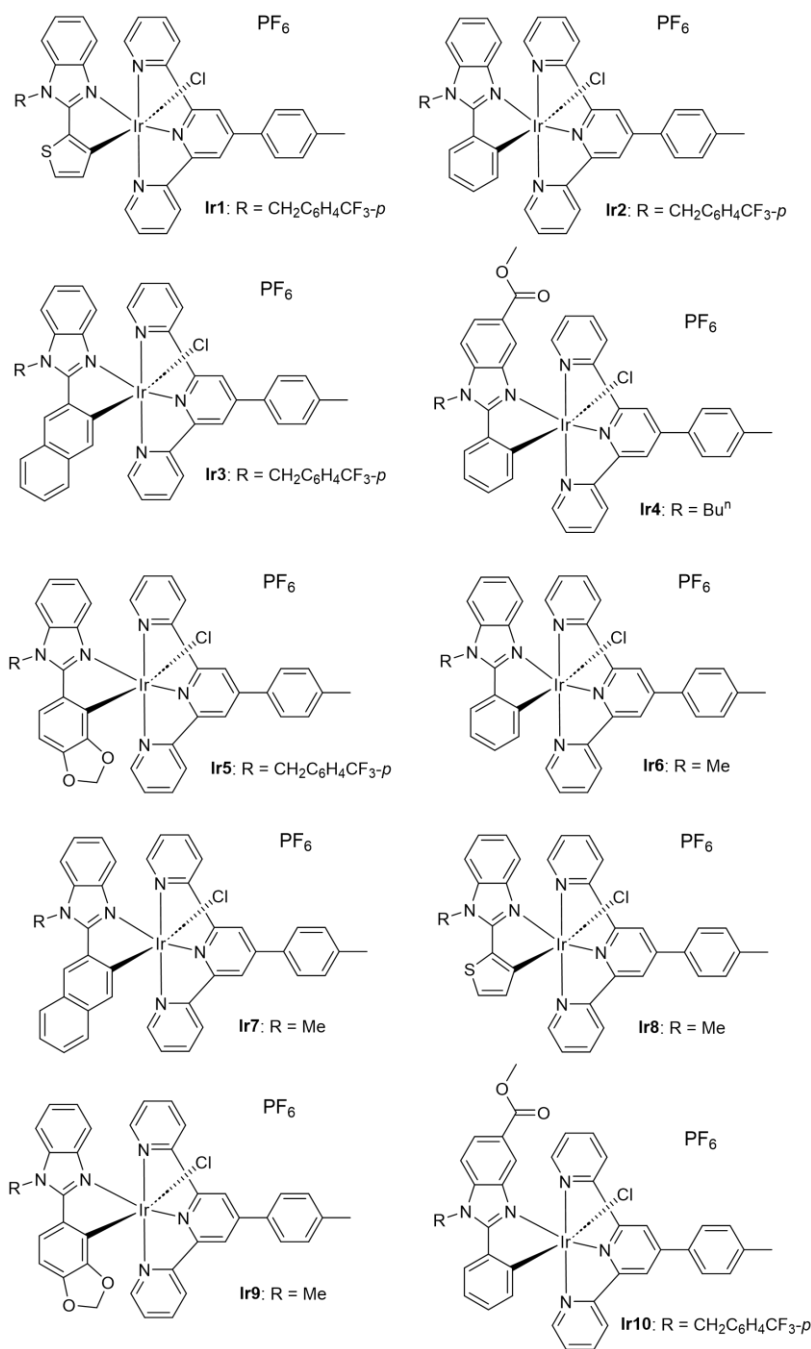
#### 4.1.2 Studované iridiové komplexy

Komplexy na bázi přechodných kovů hrají již po několik desítek let důležitou roli v léčbě nádorových onemocnění. Vedle účinných a hojně využívaných platinových chemoterapeutik se v současné době výzkum zaměřuje na vývoj sloučenin s centrálním atomem iridia, které představují velmi tvárný systém se schopností modulace jejich chemických parametrů (lipofilita, rozpustnost a fotoaktivovatelnost) [64], [65]. Tyto charakteristické vlastnosti umožňují podané léčivo kombinovat i s jinými terapeutickými přístupy (chirurgickým zákrokem, fotodynamickou terapií) pro dosažení vyšší účinnosti aplikované léčby. Tento potenciál iniciuje syntézu a testování nových sloučenin na bázi přechodných kovů [65].

V nedávné době byla popsána nová skupina cyklometalovaných Ir(III) komplexů strukturně odvozených od iridiových fotosenzitizérů typu  $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]^+$ ,  $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{C}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{C})]^+$ ,  $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]^{2+}$  a  $[\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{N})_2]^{3+}$ , konkrétně se jedná o jeden nově syntetizovaný a devět dříve studovaných iridiových komplexů s obecným chemickým vzorcem  $[\text{Ir}(\text{tppy})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{PF}_6$  (Obrázek 9). Na centrální atom iridia v oxidačním stavu +III těchto koordinačních sloučenin je vázán terdentátní ligand 4'-(p-tolyl)-2,2':6',2''-terpyridin (tppy) a různé C,N-donorové ligandy obsahující deprotonovaný 2-arylbenzimidazolový skelet [66]. Dřívější studie potvrdily fototoxické účinky ligandu tppy, který po ozáření indukuje fotokatalytickou oxidaci NADH na  $\text{NAD}^+$ , čímž dochází k vyčerpání enzymatického kofaktoru účastnícího se mitochondriálního elektronového transportního řetězce. Dochází tak k narušení transportu elektronů a buněčné homeostázy hypoxických nádorů, které vedou k oxidačnímu stresu v mitochondriích [49], [67]. Ligand tppy zároveň poskytuje po fotoaktivaci selektivní rozpoznání rakovinných buněk pomocí vyvolané fluorescence [67], [68]. Tento přístup na bázi fotodynamické terapie v současnosti umožňuje zefektivnění chirurgických zákroků (kyseliny 5-aminolevulovou; 5-ALA, různých derivátů porfirinů) [69], [70]. Na deprotonovaný 2-arylbenzimidazolový skelet  $\text{C}^{\wedge}\text{N}$  ligandu byly pak vloženy strukturní modifikace a navázány různé řetězce, které zásadně ovlivnily optické vlastnosti a biologickou aktivitu (antiproliferativní a antimetastatický účinek) komplexů [71], [72], [73], [74], [75]. Tyto iridiové komplexy s oktaedrickou geometrií byly získány v 95% čistotě (potvrzení měřením pomocí RP-HPLC) ve formě oranžové krystalické látky stabilní na vzduchu. Absorpční maximum těchto látek je v modré oblasti vlnových délek (při 405 nm) [66].

Studie ukázaly, že nově syntetizované komplexy s obecným vzorcem  $[\text{Ir}(\text{TTPY})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{PF}_6$  vykazují antimetastatické účinky u buněčné linie tripl-negativního karcinomu prsu (MDA-MB-231). Dále bylo zjištěno, že tyto lipofilní sloučeniny pronikají přes cytoplazmatickou membránu buněk prostřednictvím pasivní difúze a selektivně se akumulují v cytoplazmě a mitochondriích (v případě komplexů Ir1 – Ir3 a Ir6 – Ir8). Bylo prokázáno, že ošetření buněk MDA-MB-231 karcinomu prsu komplexy indukovala časnou apoptózu v těchto buňkách [66].

Zásobní roztoky iridiových komplexů studovaných v rámci této práce byly rozpuštěny v DMSO [66]. Testované sloučeniny byly solubilizovány na konečnou koncentraci 5 mM. Před testováním byly ze zásobních roztoků komplexů připraveny koncentrační řady sériovým zředěním v buněčném kultivačním médiu. Toxicitě DMSO se předešlo zředěním zásobních roztoků sloučenin, konečná koncentrace DMSO v buněčném kultivačním médiu nepřesáhla 0,5 % v/v.



Obrázek 9: Struktury testovaných látek.

#### 4.1.3 Buněčné linie

Buněčná linie lidského glioblastomu U87MG byla zakoupena z americké sbírky tkáňových kultur (ATCC®; USA). Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (hiPSC) byly zakoupeny od firmy Gibco. Buňky hematoencefalické bariéry (BBB) hCMEC/D3 byly získány z evropské sbírky ověřených buněčných kultur (ECACC). Lidské buňky glioblastomu U87MG-RFP produkující červený fluorescenční protein (RFP) byly pořízeny z firmy Cellomics (USA).

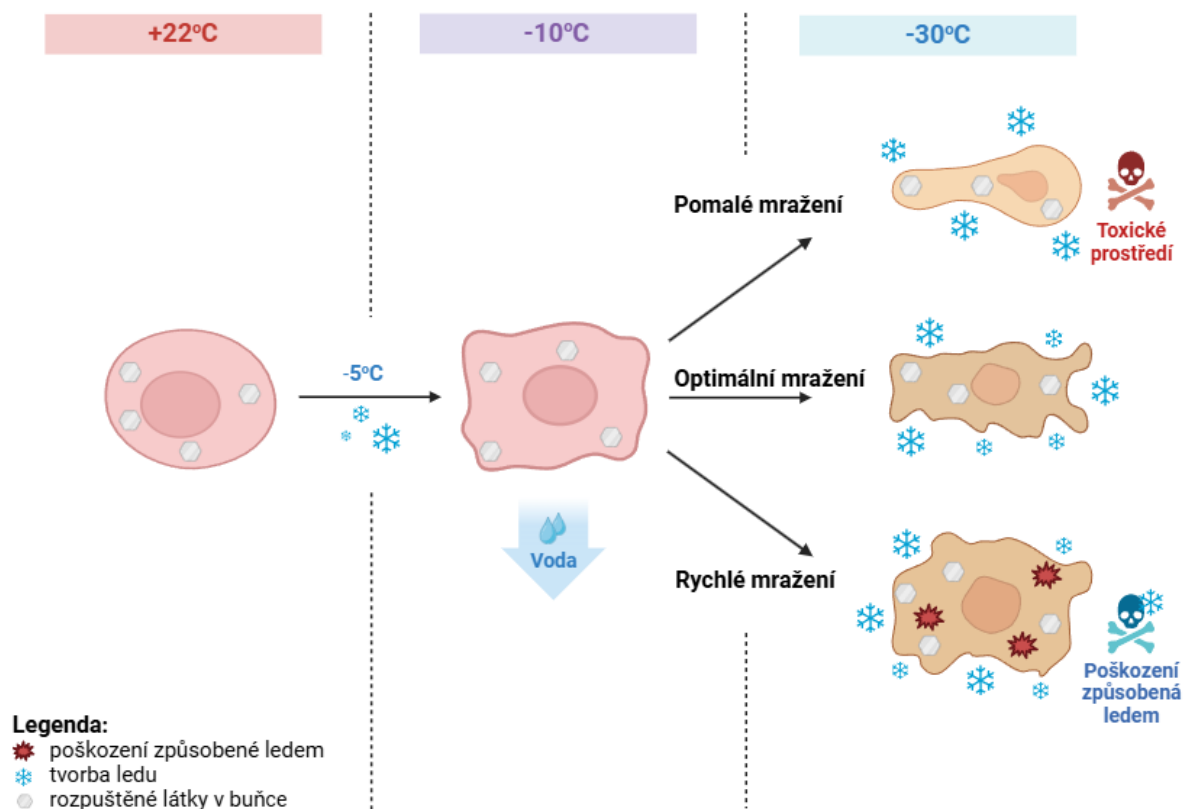
## 4.2 Metody

### 4.2.1 Kryokonzervace a rozmražení buněk

Kryokonzervace neboli proces skladování živých buněk při nízkých teplotách, a rozmrazování organického materiálu představují zásadní rutinní postupy biomedicínského výzkumu, buněčné terapie a buněčné banky, ovlivňující vitalitu a možnost dalšího využití buněčných kultur [76]. Kryokonzervace umožňuje skladování buněk nebo organického materiálu po dobu až několik desítek let, ve stavu s pozastavenou metabolickou aktivitou, pro snížení jejich poškození v důsledku chemické reaktivity a času [76]. Buňky lze v případě potřeby rozmrazit a resuscitovat. Buňky jsou kryokonzervovány nejen pro zachování vzorku pro jeho další studium, ale také pro zamezení genetického driftu (fenotypový posun) v kontinuálních buněčných liniích nebo proti transformaci nebo diferenciaci v nekontinuálních buněčných liniích, jako jsou kmenové buňky a primární buňky [76], [77]. V případě využití optimální kryokonzervace buněk, skládající se ze správných metod zmrazování a rozmrazování, získáváme ověřené, stabilní a konzistentní buněčné linie s minimální ztrátou životaschopnosti [78]. Jedná se tedy o souhrn odlišných optimalizovaných metod zmrazování (Obrázek 10) a rozmrazování, které napomáhají lepšímu uchycení a přežití rozmražených buněk. Tyto přístupy se liší nejen rychlostí, způsobem provedení, ale i náročností [78].

Jako nejvýhodnější se ukázala kombinace postupu pomalého mražení za přítomnosti kryoprotektivních činidel (dimethylsulfoxid (DMSO)) [78], [79], které zabraňují tvorbě ledových krystalků poškozujících buněčné membrány [76], [80], a rychlého rozmražení, které zamezí další interakci kryoprotektivních činidel s buněčnou kulturou. Protokol pomalého zmrazování (zmrazování s řízenou rychlostí) přispívají k velmi dobré obnově buněk po rozmražení [80]. Během procesu zmrazování se kryozkumavky umístí do kryokontejnerů, které umožňují pomalé zmrazování s řízenou rychlostí (1 °C/1 min) v mrazicích boxech na teplotu -80 °C. Poté se kryozkumavky přemístí do dewarovy nádoby s kapalným dusíkem nebo do mrazniček na teplotu -150 °C pro dlouhodobé skladování [80].

Zamrazovaná buněčná linie by měla obsahovat především zdravé buňky v jejich aktivní fázi růstu (logaritmická fáze) ve vhodné koncentraci [80]. Koncentrace zamražených buněk na jednu kryoampuli se může mezi různými kulturami lišit, nejčastěji se ale pohybuje v rozmezí  $1 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$  buněk/ml v mrazicím médiu, a odvíjí se i od aktuálního stavu buněčné linie, při dodržení v ideálním případě 70–80 % jejich maximální konfluence.



Obrázek 10: Proces kryokonzervace buněk. Převzato a upraveno z [81].

#### 4.2.1.1 Rozmražení buněk

Eppendorfovou mikrozkušavku vyjme z dewarovy nádoby, vložíme ji do kádinky s demineralizovanou vodou a umístíme na chvíli do vodní lázně temperované na teplotu 37 °C. Rozmraženou ampuli otevřeme v laminárním boxu pomocí buničiny s 70% ethanolem, kterým pečlivě rozmraženou mikrozkušavku oťreme. Obsah mikrozkušavky se spolu s 5 ml kultivačního média přenesou do 15 ml kónické zkumavky (falkonky) a zcentrifuguje (250 g, 3 min, 25 °C). Médium se odsaje a k buněčnému peletu se přidá čisté kultivační médium. Takto připravená kultura je nasazena do vhodné kultivační nádoby a kultivována.

Při rozmrazování linie indukovaných pluripotentních kmenových buněk (hiPSC) bylo nejprve dno kultivační nádoby pokryto tzv. extracelulárním lešením, které vytváří prostředí vhodné pro 3D modelaci buněčných kultur. Na jednu jamku 6ti-jamkové destičky se následně napipetovalo 1,5 ml roztoku Geltrex (Gibco), který byl krouživým pohybem rovnoměrně rozprostřen po dně jamky. Po celou dobu manipulace byl Geltrex umístěn v nádobě s ledem (zamezení gelace roztoku). Do okolních jamek se napipetovalo 1,5 ml vychlazeného PBS, které zabraňuje vysychání finální vrstvy geltrexu a zbytečné ztrátě média. Takto připravená destička byla umístěna na 1 hodinu do inkubátoru (teplotě 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>). Mikrozkušavka s buněčnou kulturou byla následně vložena do kádinky s demineralizovanou vodou a umístěna na chvíli do vodní lázně. V mezičase bylo připraveno kultivační médium. Do 15 ml zkumavky se napipetovalo 9 ml StemFlex™ basalního média (DMEM/F12; 1:1) od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA), které se obohatilo o 1 ml StemFlex™ Supplement od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA) a 25 µl Gentamycinu (5 mg/ml)

od firmy Serva (Heidelberg, Německo). Připravené kultivační médium bylo důkladně zvortexováno. Rozmražená mikrozkušavka byla otevřena ve flowboxu pomocí buničiny s ethanolem, kterým byla nejprve mikrozkušavka pečlivě otřena. Obsah mikrozkušavky se spolu s 3 ml kultivačního média (2 ml se napipetovali přímo do 15ml zkušavky a 1 ml se využil k oplachu mikrozkušavky) přenesl do 15 ml zkušavky a zcentrifugoval se na program buňky (250 g, 3 min, 23 °C). Medium nad usazeným buněčným peletem se následně odsálo a k peletu se přidaly 2 ml čistého kultivačního média a 20 µl RevitaCell™ Supplementu (podpora rozmražení) od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA). Směs se pomocí pipety důkladně promíchala. Z inkubátoru se vytáhla 6jamková destička, z jamky potažené Geltrexem se odsála přebytečná tekutina a na jamku se po kapkách přenesla pipetou homogenní buněčná směs. Nasazená buněčná kultura se umístila do inkubátoru. Po 24hodinové kultivaci bylo z nasazené jamky 6jamkové destičky opatrně odsáto původní médium. Buňky byly opláchnuty 1 ml předeřátého DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) od firmy Corning (USA), které bylo poté nahrazeno 1 ml čistého dříve připraveného kultivačního média neobsahující RevitaCell™ Supplement.

#### **4.2.1.2 Zamražení buněk**

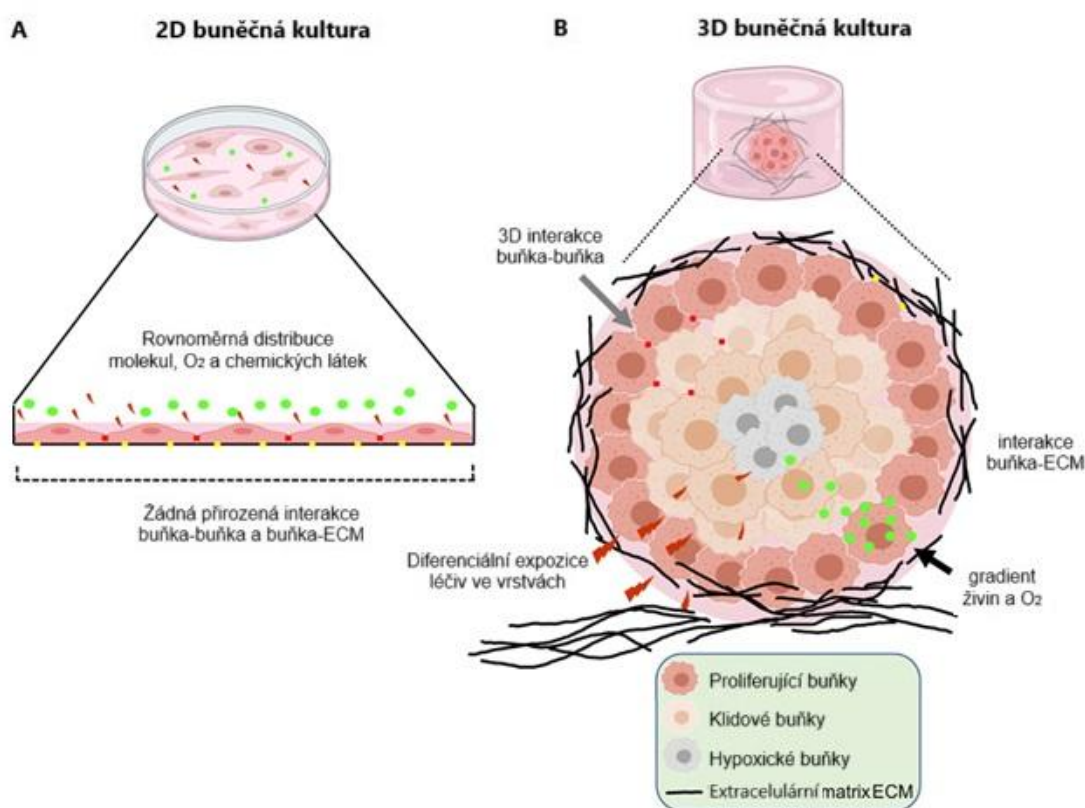
Při kryokonzervaci standartních nádorových 2D kultur (v našem případě U87MG) se používá speciální zamrazovací medium, které je obohaceno o 20% FBS a 5% DMSO (dimethylsulfoxid). Médium nutné pro zamražení 4 mikrozkušavek se skládá z 3,6 ml kultivačního média (obsahuje již 10% FBS) a 400 µl FBS nebo z 9 ml média a 1 ml FBS. Kultivované buňky jsou sklizeny do 15 ml zkušavky, centrifugovány, původní médium se odsaje a buněčný pelet se zvortexuje s připraveným zamrazovacím mediem. Do jedné mikrozkušavky se přidá 1 ml takto připravené suspenze. Do každé mikrozkušavky se následně přidá 50 µl přefiltrovaného DMSO (přes injekční 10 ml stříkačku s nasazeným filtrem s velikostí pórů 0,2 µm). Mikrozkušavky se poté uzavřou víčkem, popíšu se a v kryokontejneru se vloží do mražáku (-80 °C).

Při zamrazování linie indukovaných pluripotentních kmenových buněk (hiPSC) je nejprve z vybrané jamky odsáto původní médium (1 jamka počtem buněk odpovídá potřebnému množství buněk na jednu mikrozkušavku). Buňky byly poté dvakrát opláchnuty 1 ml DPBS. Následně se do jamky napipetovalo 400 µl VERSENE solution (uvedený objem pro jednu jamku 12jamkové destičky) od firmy Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA), který se nechal působit po dobu 3–5 minut v inkubátoru. Po uplynutí časového intervalu byl roztok versenu odpipetován a do jamky byl napipetován 1 ml Stem Flex média, složeného z 9 ml StemFlex™ basalního média obohaceného o 1 ml StemFlex™ Supplement a 25 µl Gentamycinu. Pomocí automatické pipety se intenzivně, ale opatrně spláchnula celá buněčná kultura, která se přemístila do 15 ml zkušavky. Buněčná suspenze byla centrifugována (200 g, 4 min, 23 °C). Medium nad usazeným buněčným peletem se následně odsálo, k peletu se přidal 1 ml Cryo média, směs se důkladně promíchala a přesunula do popsané mikrozkušavky určené k zamrazení.

#### 4.2.2 2D kultivace a pasážování nádorových buněk

Buněčná kultura je nepostradatelným a široce používaným nástrojem biomedicínského výzkumu, tkáňového inženýrství, regenerativní medicíny a průmyslových postupů [82]. Buněčné kultury umožňují podrobněji pochopit buněčnou biologii, tkáňovou morfolologii, mechanismy onemocnění, působení léků, produkci proteinů a funkci jednotlivých genů [57].

Kultivace buněčných kultur je proces cíleného udržování a rozmnožování buněk nebo tkáně mimo organismus v umělém prostředí laboratoře za kontrolovaných podmínek vhodných pro přežití, proliferaci a funkci biologického materiálu [83]. Existuje mnoho metod buněčné kultivace, z níž každá ovlivňuje chování a morfolologii nádoru [82]. Na základě rozdílného způsobu kultivace lze buňky rozdělit na adherentní a suspenzní [84]. Nejčastěji používané při screeningu potenciálních léčiv jsou adherentní 2D buněčné kultury (Obrázek 11) [57], které rostou jako monovrstva přichycená (adherující) na dno kultivační nádoby v důsledku sekrece proteinů extracelulární matrix (laminin, fibronectin, kolagen) [83], [85].



Obrázek 11: Porovnání 2D a 3D kultivace. Převzato a upraveno z [86].

Buňky kultivované *in vitro* v průběhu času vyčerpávají živiny dodávané v médiu, rostou, množí se a uvolňují toxické metabolity. Většina adherentních buněčných linií roste v kultivačních nádobách do dosažení vysokého procenta konfluence (~80 %), tedy do stavu, kdy buňky zaplní povrch dna kultivační nádoby a dostanou se do vzájemného kontaktu, čímž dochází k tzv. kontaktní inhibici [85]. V této době je nezbytné, pro další rozšíření a udržení viabilní kultury, provést subkultivaci, neboli pasážování. Při pasážování dochází k vytváření subkultur přenosem buněk z původní kultury do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem.

Adherentní buňky jsou při pasážování disociovány z kultivačního povrchu enzymatickým štěpením (trypsin, dispáza, kolagenáza, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)) nebo mechanickým narušením (seškrábnutí buněk škrabkou) adhezující buněčné monovrstvy [83], [85].

I přes výrazné zjednodušení kultivace buněk v porovnání se situací před padesáti lety, existuje stále mnoho přetrvávajících problémů, kterým je i dnes třeba čelit pro získání reprodukovatelných výsledků. Navzdory jednoduchosti této metody má každá buněčná linie mírně odlišné požadavky, fenotyp a chování [84]. Neexistuje tedy uniformní protokol pro všechny buněčné linie. Práce s buněčnými kulturami vyžaduje tedy znalosti jejich potřeb, fenotypů a růstových vzorců za různých fyzikálních a nutričních podmínek [84].

### **Pracovní postup**

Pro 2D experimenty byly buňky glioblastomu U87MG kultivovány v živném médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, s vysokým obsahem glukózy, 4,5 g/l) od firmy Biosera (Francie). Médium bylo obohaceno o antibiotikum gentamycin ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) zakoupeno od firmy Merck (Česká republika) a 10% tepelně inaktivované hovězí sérum (FBS; 10%) od firmy Biosera (k 500 ml média se přidá 55 ml FBS a 2,5 ml gentamycinu). Buňky byly kultivovány v podmínkách plně humidifikovaného inkubátoru při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ . Buňky byly pasážovány 2–3krát týdně s ohledem na růstový profil linie. Při pasážování bylo nejprve z kultivační nádoby odsáto původní médium a kultura byla opláchnuta 2 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) o teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , které bylo následně odsáto. Do kultivační nádoby se dále napipetovalo 0,5 ml desetkrát zředěného roztoku Trypsinu, který se nechal působit 3 minuty. Následně byl buněčný pelet sklizen pipetou s 5 ml čistého média DMEM, přemístěn do 15 ml zkumavky a zcentrifugován (250 g, 3 min,  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Médium nad usazeným buněčným peletem se odsálo a k peletu se přidalo 5 ml čistého kultivačního média. Směs se důkladně promíchala, pomocí automatické počítačky buněk se stanovilo množství a viabilita připravené buněčné kultury. Na základě získané hodnoty byl ze připravené směsi odebrán vypočítaný objem kultury odpovídající  $1\cdot 10^6$  buněk. Tento objem byl nasazen do nové kultivační nádoby s čerstvým médiem. Nasazení buněk pro potřeby konkrétních experimentů se odvíjelo od aktuálního stavu buněčné linie, při dodržení maximálně 90% konfluence.

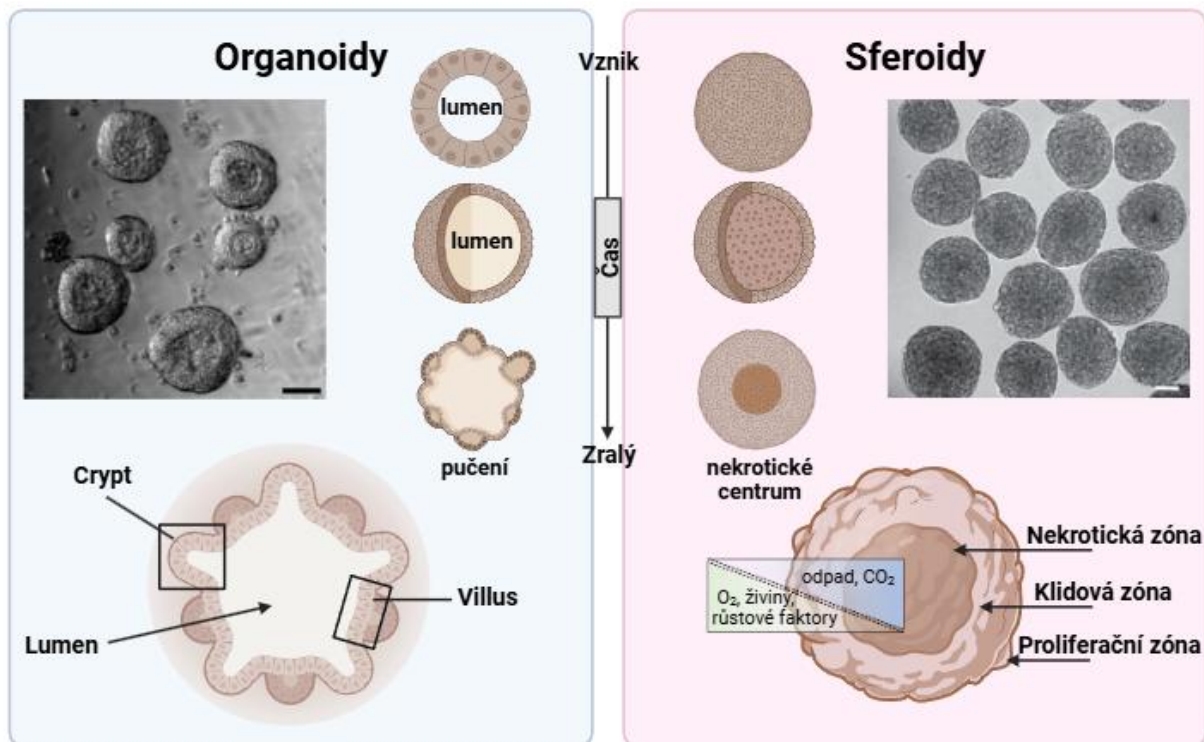
V případě BBB buněčné linie hCMEC/D3 bylo při kultivaci využito živné médium EndoGRO™ médiu (Human epidermal basal medium) od firmy Lonza (Basilej, Švýcarsko) obohacené o antibiotikum gentamycin ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) zakoupené od firmy Merck (Česká republika) a 1 ng/ml FGF2 od firmy Merck (Česká republika). Buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ . Pasážování bylo prováděno 2–3krát týdně s ohledem na růstový profil linie. Při pasážování byl nejprve připraven 20x zředěný roztok extracelulární matrice přidáním 1 ml kolagenu typu I do 19 ml studeného PBS. Připravený roztok se důkladně promíchal. Poté se 5–10 ml roztoku zředěného kolagenu aplikovalo do kultivační nádoby T75, která se umístila na 1 hodinu do inkubátoru (teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 5%  $\text{CO}_2$ ). Následovalo opatrné odsátí původního média z buněčné kultury. Buňky byly promyty 2 ml PBS. Na vrstvu buněk se aplikovaly 3 ml roztoku Trypsin–EDTA, který se nechal působit po dobu 3 minut. Dále byl buněčný pelet přenesen pomocí pipety s 8 ml připraveného média do 15 ml falkonky

a zcentrifugován (250 g, 3 min, 23 °C). Supernatant nad usazeným buněčným peletem se odstraní, k peletu se přidá 5 ml čistého kultivačního média, buňky se důkladně rozsuspendovaly a spočítaly. Požadovaný objem kultury byl nasazen do kultivační nádoby potažené kolagenem s čerstvým médiem.

Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky byly kultivovány v obohaceném živném médiu StemFlex od firmy Gibco. Buňky byly pasážovány s ohledem na proliferaci maximálně 1krát týdně. Při pasážování této buněčné linie byla nejprve pokryta jedna jamka 6ti-jamkové destičky 750 µl roztoku Geltrex, který se nechal po 1 hodinu gelovatět v inkubátoru. V mezičase bylo 9 ml StemFlex™ basalního média (DMEM/F12; 1:1) obohaceno 1 ml StemFlex™ Supplementu a 20 µl Gentamycinu. Následně bylo z kultivační nádoby odsáto původní médium a kultura byla dvakrát opláchnuta 2 ml DPBS o teplotě 37 °C. Do kultivační nádoby se poté napipetoval 1 ml roztoku VERSENE od firmy Gibco, který se nechal působit 3–5 minut v inkubátoru. Následně byl roztok versenu nad buněčným peletem opatrně odsát a buňky byly pomocí pipety s 1 ml připraveného kultivačního média opatrně sklizeny z povrchu půdní matrice. Buňky se přenesly do 15 ml zkumavky, která se zcentrifugovala (250 g, 3 min, 23 °C). Médium nad usazeným buněčným peletem se odsálo a k peletu se přidaly 2 ml čistého média. Z jamky potažené Geltrexem se odsála přebytečná tekutina a na jamku se po kapkách přenesla pipetou buněčná směs.

### 4.2.3 3D kultivace

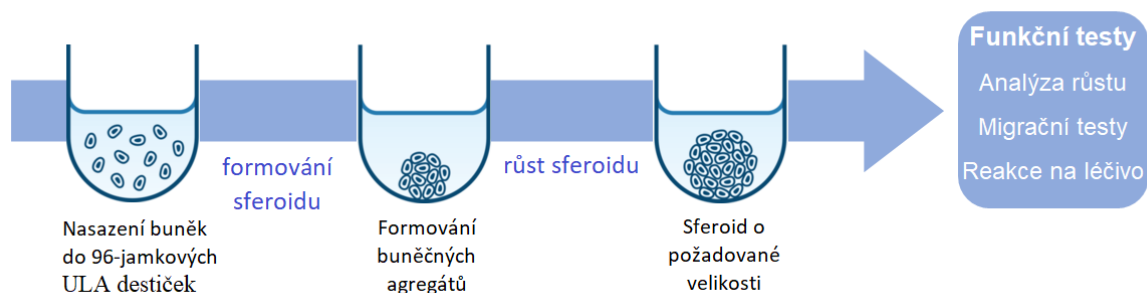
V současné době představují 2D buněčné kultury nejrozšířenější screeningovou techniku využívanou při testování léčiv, porozumění jejich účinku, ale také při porozumění mechanismu vzniku onkologických onemocnění [55]. Tato metoda má bohužel mnoho omezení, jako jsou narušená interakce buněk s extracelulárním prostředím [57], změny v morfologii, polaritě a genotypu buněk, které značně snižují věrohodnost získaných dat [55]. Pro překonání těchto obtíží v předklinickém testování léčiv byl vytvořen trojrozměrný model buněčné kultury (Obrázek 11) [59]. Existuje mnoho typů 3D buněčných modelů, z nichž nejvyužívanější jsou sferoidy a organoidy (Obrázek 12) [58]. 3D kolonie představují modelové prostředí, ve kterém probíhá velká část procesů běžných za *in vivo* podmínek (např. buněčná diferenciaci, angiogeneze, rozdílný přístup buněk k nutrientům, tedy tzv. nutriční gradient atd.). Trojrozměrné mikrotkáně se tedy velice blíží *in vivo* systému [61], [62].



Obrázek 12: Porovnání dvou nejčastějších 3D buněčných modelů. Převzato a upraveno z [87].

#### 4.2.3.1 Sferoidy

Sféroidy jsou jednoduché shluky buněk široké škály typů s definovanou geometrií [55]. Sferoidy lze vytvořit mnoha rozdílnými přístupy. Výhodou tohoto 3D modelu je jeho samosestavování spontánní agregací buněk jak v samostatném živném médiu, tak za použití speciálních lešení. Při 3D kultivaci buněk se mohou aplikovat rozdílné metody přípravy využívající například speciální lešení (technologie zavěšených kapek, rotační kultury), živných gelů a bioreaktorů, nebo kombinací všech zmíněných přístupů [55], [88]. V našem případě byla pro formování sferoidů použita technika kultivace buněk v mikrodestičkách Corning® se zaoblenými dny potaženými Ultra-Low Attachment povrchovým povlakem zabraňujícím přichycení buněk k povrchu jamky a podporující tvorbu sféroidů (Obrázek 13). V kombinaci se speciálně sestaveným médiem pak poskytuje tento systém vhodné podmínky k vytvoření 3D buněčných sferoidů [89]. Velkou výhodou tohoto systému je poměrně snadná příprava takovýchto modelových 3D buněčných systémů [89], [90].



Obrázek 13: Postup tvorby sféroidu. Převzato a upraveno z [91].

### Pracovní postup

Pro studium mechanismu působení studovaných komplexů za fyziologicky relevantnějších podmínek byly vytvořeny mikrotumory (3D sféroidy) z buněk U87MG. Buňky U87MG byly kultivovány v 3D formovacím médiu DMEM-F12 obohaceném růstovými faktory. Před zahájením samotného formování 3D modelu bylo připraveno kultivační médium do 50 ml zkumavky doplněním 48,3 ml DMEM/F12 média 1 ml 2% B27 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), 1  $\mu$ l epidermálního růstového faktoru (EGF; Sigma Aldrich, Německo, 20 ng/ml), 20  $\mu$ l fibroblastového růstového faktoru (FGF2; Sigma Aldrich, Německo, 10 ng/ml), 250  $\mu$ l hovězího sérového albuminu (BSA; Sigma Aldrich, Německo, 0,15 %) a 25  $\mu$ l Gentamycinu (antibiotikum; 5 mg/ml). Z kultivační nádoby bylo následně odsáto původní médium, kultura byla opláchnuta 1 ml PBS a buňky byly trypsinizovány po dobu 3 minut v 0,5 ml desetkrát zředěného roztoku Trypsinu. Poté bylo k buňkám přidáno 5 ml nového média, buňky byly spočítány pomocí automatické počítačky a potřebné množství buněčné suspenze bylo přemístěno do 15 ml zkumavky, která byla zcentrifugována (250 g, 3 min, 23 °C). Médium nad usazeným buněčným peletem se odsálo a k peletu se přidalo potřebné množství připraveného 3D formovacího média (100  $\mu$ l média na jamku). Buňky byly pro experimenty s 3D sféroidy nasazeny v hustotě 2500 buněk na jamku 96jamkové destičky se zaobleným dnem potaženým Ultra-Low Attachment povrchem (Corning, USA), který zabraňuje ulpívání buněk na povrchu destičky a podporuje vznik sferoidních 3D buněčných struktur. Buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 72 hodin, během tohoto času došlo k efektivnímu zformování sféroidů.

#### 4.2.3.2 Organoidy

Organoidy jsou složité shluky orgánově specifických buněk vyvinutých z embryonálních kmenových buněk (Obrázek 12), indukovaných pluripotentních kmenových buněk nebo z dospělých tkáňově specifických kmenových buněk [58]. Kmenové buňky mají schopnost sebeorganizace a diferenciaci [55]. Za správných podmínek a v prostředí s extracelulárním lešením, jako je matrice Corning® Matrigel® nebo kolagen [59], tvoří struktury, které napodobují anatomii orgánu *in vivo* [55]. Jedním z hlavních omezení pro rutinní používání tohoto 3D systému je obtížná standardizace postupu přípravy [58].

## Pracovní postup

Cerebrální organoidy byly generovány pomocí řízené čtyřstupňové diferenciaci z lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (hiPSC; Gibco). hiPSC buňky byly kultivovány na bazální membránové matrici Geltrex™ se sníženým růstovým faktorem (Gibco) v bazálním médiu StemFlex (DMEM/F12; 1:1) obohaceném o StemFlex supplementary (Gibco).

První fáze přípravy cerebrálních organoidů (0.–5. den) zahrnuje tvorbu zárodečných embryoidních tělísek (EB). Během tohoto kroku bylo od hiPSC opatrně odsáto původní médium, buňky byly opláchnuty PBS a ko-inkubovány s 1 ml roztoku versenu po dobu 8 minut. Následně byl buněčný pelet přemístěn do falkonky s 1 ml Stemdiff Cerebral organoidního média. Stemdiff Cerebral organoidní médium bylo připraveno obohacením 40 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního bazálního média 1 o 10 ml STEMdiff cerebrálního organoidního supplementu A a 50  $\mu$ l 10 mM Rock inhibitoru (Y-27632; Dihydrochloride; 1  $\mu$ l inhibitoru/1 ml média; finální koncentrace 10  $\mu$ M). Buněčná suspenze byla centrifugována při 300 g po dobu 5 min. Supernatant nad usazeným buněčným peletem se následně odsál a k peletu se přidal 1 ml dříve připraveného kultivačního média. hiPSC byly nasazeny v hustotě 9000 buněk na jamku 96jamkové destičky se zaobleným dnem potaženým Ultra–Low Attachment povrchem (ULA, Corning). EB byly kultivovány po dobu 4 dnů, pro docílení EB kulatého tvaru s průměrem okolo 400  $\mu$ m. Ve 2. a 4. dnu od nasazení experimentu bylo EB vyměněno médium.

Ve druhé fázi přípravy organoidů (5.–7. den) byly 2 EB přeneseny na jednu jamku 24-jamkové ULA destičky. Diferenciaci buněk na nervový ektoderm byla indukována pomocí Stemdiff cerebrální organoidové sady (StemCell Technologies, CA) po dobu dvou dnů. EB byly kultivovány v 0,5 ml indukčního média na jednu jamku, připraveného přidáním o 0,5 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního supplementu B do 49,5 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního bazálního média 1. Na konci této fáze měly EB průměr v rozmezí 500–800  $\mu$ m.

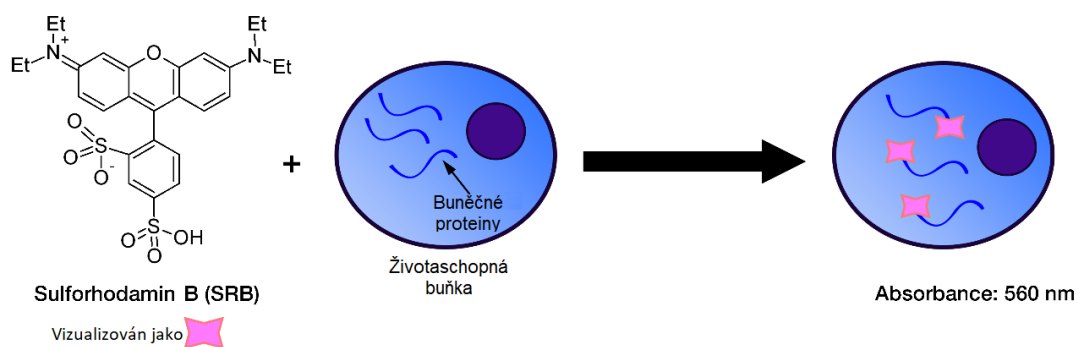
Následně byly rané organoidy přesunuty pomocí pipety na zalévací povrch (Parafilm®) do sterilní misky o průměru 100 mm, z každého EB bylo odstraněno přebytečné médium a pomocí pipety byl každý EB zabudován do 15  $\mu$ l matrice Matrigel (Corning). Poté se miska umístila do inkubátoru na 30 minut, během kterých Matrigel® polymerizoval. Po zalití byly organoidy (12–16 organoidu/jamku) kultivovány na 6-jamkových ULA destičkách za kontinuálního orbitálního třepacího míchání (50 ot./min.) ve 3 ml expanzního média (dříve připravené médium obsahující 24,25 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního bazálního média 2, 0,25 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního supplementu C a 0,5 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního supplementu D) podporující další diferenciaci na neuroektoderm.

Po 72hodinové inkubaci bylo expanzní médium nahrazeno médiem maturačním (3 ml/jamku), připraveným doplněním 2 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního supplementu E do 98 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního bazálního média 2. Organoidy byly kultivovány dalších 22 dní, aby se vyvinuly plně zralé mozkové organoidy se středním průměrem 1,5–2,5 mm. Během této fáze bylo každé 3–4 dny vyměněno médium.

#### 4.2.4 Antiproliferační aktivita

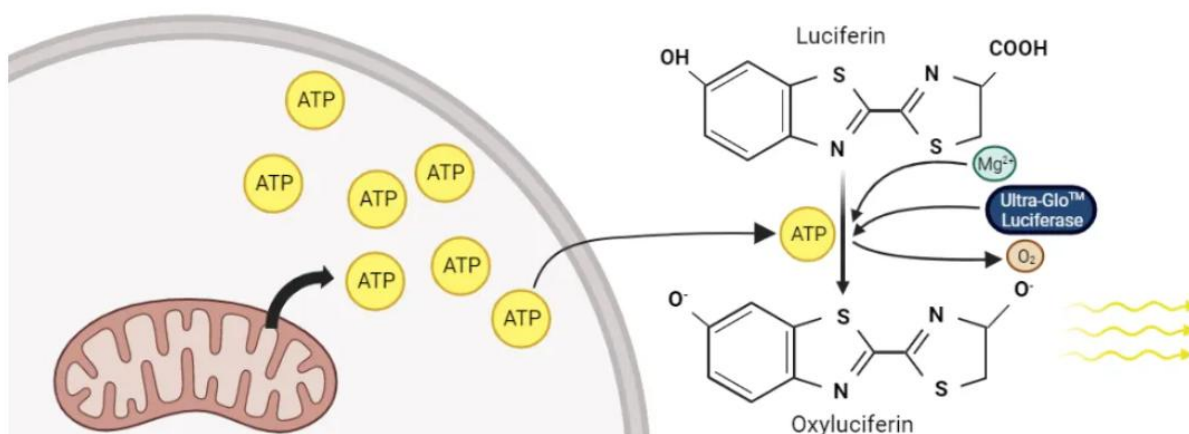
Hodnocení cytotoxicity nebo antiproliferační aktivity komplexů je jednou z prvních charakteristik v rámci testování nových sloučenin s potenciálně protinádorovým účinkem, která představuje přímou a diskriminační metodu pro účinné vyhodnocení budoucích vyhlídek studovaných sloučenin [92], [93]. Cytostatický nebo antiproliferační účinek je schopnost látky inhibovat nebo zastavit růst a dělení buněk. Oproti cytotoxickým látkám, které mohou způsobit smrt buněk, cytostatické látky často blokují buněčný cyklus, což zabraňuje růstu a proliferaci buněk, ale nezpůsobuje přímo buněčnou smrt.

Vysoká antiproliferační aktivita látek ovšem může souviset s potenciálními vedlejšími účinky či neselektivním zabíjením rakovinných buněk. Z tohoto důvodu bývají některé sloučeniny s vysokou aktivitou vyřazeny z potenciálních preklinických nebo klinických aplikací [94]. Tato překážka se dá překonat několika způsoby. Prvním a jednodušším přístupem, souvisejícím zejména s vedlejšími účinky látky, je podávat pacientům nižší dávky komplexu. Při snížení dávek často bohužel dochází k významnému omezení aktivity sloučenin proti cílové rakovinné tkáni [95]. Další možnost představuje aplikace fotodynamické terapie [96], [97]. Při této metodě je selektivně aktivován komplex přesným ozářením nádorového ložiska laserovým světlem. Nádorové buňky jsou po ozáření selektivně destruovány, zatímco okolní tkáně jsou vystaveny pouze velmi nízkým koncentracím sloučenin, které nevyvolávají toxické účinky [98], [99].



Obrázek 14: Princip testu SRB. Převzato a upraveno z [100].

Pro získání plně reprezentativních výsledků pro klinické prostředí byla antiproliferativní aktivita studovaných sloučenin hodnocena nejen pomocí 2D kultur, ale také na 3D sféroidních modelech, které poskytují relevantnější informace o aktivitě testovaných sloučenin proti maligním tkáním v organismu pacienta [101]. Účinnost studovaných komplexů byla testována pro 2D model pomocí konvenčního SRB testu, který je založen na schopnosti barviva sulforhodaminu B vázat se v závislosti na pH na proteinové složky fixovaných buněk (Obrázek 14) [102], a proti generovaným mikrotumorům byla určena pomocí testu CellTiterGlo-3D (Promega), který umožňuje měření množství ATP i ve velkých sféroidních strukturách (Obrázek 15).



Obrázek 15: Princip testu CellTiterGlo-3D. Převzato a upraveno z [103].

### Pracovní postup

Antiproliferativní aktivita zkoumaných sloučenin byla hodnocena pomocí Sulforhodamin B (SRB) na 2D buněčných monovrstvách. Pro testy na 2D buněčné monovrstvě byly buňky U87MG nasazeny na 96jamkové destičky (TPP) pro tkáňové kultury v hustotě 3000 buněk na jamku ve 100  $\mu\text{l}$  DMEM kultivačního média. Po inkubaci přes noc v inkubátoru při 37  $^{\circ}\text{C}$  ve zvlhčené atmosféře a 5%  $\text{CO}_2$  bylo původní médium vyměněno za 100  $\mu\text{l}$  Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) a buňky byly ošetřeny testovanými sloučeninami (konečný objem 200  $\mu\text{l}$  na jamku). Poté byly buňky inkubovány se studovanými komplexy po dobu 90 minut ve tmě (5 %  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ ) a následně byly po dobu 30 min ozařovány modrým světlem (420 nm) s konečnou intenzitou 58  $\text{Wm}^{-2}$ . Na ozaření vzorků byl použit Photoreactor LZC-ICH2 (Luzchem, Kanada) předeřátý na teplotu 37  $^{\circ}\text{C}$  při ozařování. Kontrolní vzorky byly inkubovány po dobu 2 hodin ve tmě (neozářené). Po ukončení ošetření buněk bylo médium odsáto, jamky byly promyty 100  $\mu\text{l}$  PBS a naplněny 200  $\mu\text{l}$  DMEM média. Po 70hodinové inkubaci bylo médium odsáto, buňky byly dvakrát opláchnuty 100  $\mu\text{l}$  PBS a adherované buňky byly fixovány po dobu 1 hodiny při 4  $^{\circ}\text{C}$  50  $\mu\text{l}$  10% kyselinou trichloroctovou (TCA). Po uplynutí časového intervalu byla TCA odsáta, fixované buňky byly dvakrát promyty 100  $\mu\text{l}$  MQ a obarveny 0,4% roztokem SRB (50  $\mu\text{L}$ /jamku; 0,4 % v 1% kyselině octové) po dobu 30 minut. Roztok SRB byl poté odstraněn, jamky byly dvakrát opláchnuty 1% kyselinou octovou a solubilizace barviva byla provedena pomocí Tris (10 mM, pH 10,5) za kontinuálního míchání po dobu 15 minut na třepačce. Životaschopnost buněk byla vyhodnocena měřením absorbance při vlnové délce 570 nm s pomocí absorpční čtečky (SPARK TECAN; SCHOELLER). Naměřené hodnoty absorbance byly převedeny na procento kontroly (% přežití buněk). Antiproliferační účinky byly vyjádřeny jako IC50 (koncentrace testované látky, která inhibuje buněčný růst o 50 %), které byly vypočteny z křivek konstruovaných vynesemím přežití buněk (%) versus koncentrace léčiva ( $\mu\text{M}$ ).

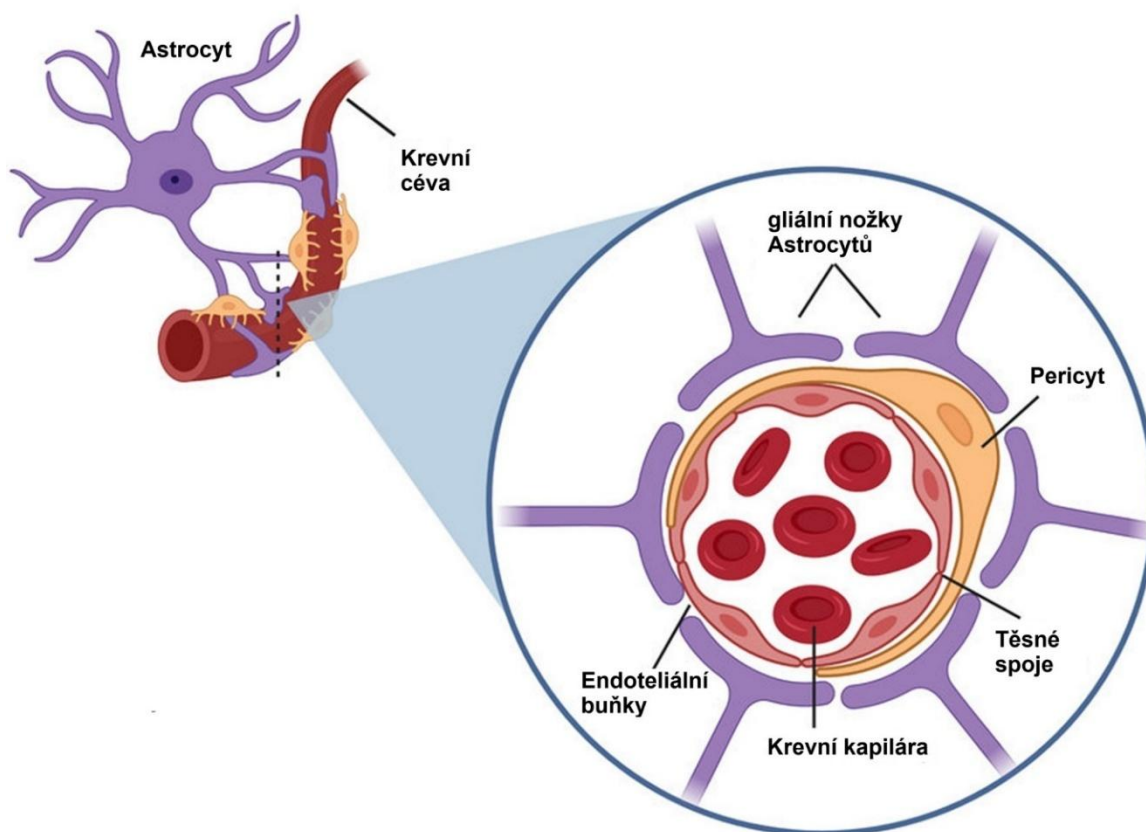
Pro stanovení antiproliferativní aktivita zkoumaných sloučenin za 3D podmínky byly připraveny z buněk U87MG 3D sféroidy. Buňky byly nasazeny v hustotě 2500 buněk na jamku 96jamkové destičky ve tvaru U s ultranízkou přilnavostí (Corning, USA) a kultivovány v 3D

formovacím médiu DMEM–F12 doplněném růstovými a sféroidními faktory (2% B27, 20 ng ml<sup>-1</sup> EGF, 10 ng ml<sup>-1</sup> FGF2 a 0,15 % BSA) po dobu 72 hodin. Po 72–hodinovém formování sferoidů byly vzorky ošetřeny testovanými sloučeninami a ozářeny, stejným způsobem, jak bylo popsáno pro 2D kultury. Následně byly sferoidy kultivovány v čistém 3D médiu po dobu 70 hodin. Po 70hodinové inkubaci bylo do každé jamky 96jamkové destičky přidáno 100 µl CellTiter-Glo® 3D Reagent (Promega, USA) a destička se za pokojové teploty intenzivně míchala po dobu 5 minut. Pro stabilizaci luminiscence byly destičky inkubovány dalších 25 minut při pokojové teplotě. Životaschopnost buněk byla vyhodnocena měřením luminiscenčního signálu s pomocí čtečky SPARK (Tecan, Manedorf, Švýcarsko). Antiproliferativní účinky byly vyjádřeny jako hodnoty IC<sub>50</sub>, které byly vypočteny z křivek konstruovaných vynesáním přežití buněk (%) versus koncentrace léčiva (µM). Hodnoty poté byly převedeny na procento kontroly (% přežití buněk).

Index fototoxicity byl získán porovnáním hodnot IC<sub>50</sub> stanovených za tmy a IC<sub>50</sub> stanovených pro ozářené vzorky. Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních, pro zajištění spolehlivosti a reprodukovatelnosti výsledků. Kromě toho byly koncentrace sloučenin v médiu během ošetření ověřeny pomocí bezplamenové atomové absorpční spektroskopie (FAAS) nebo hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP–MS).

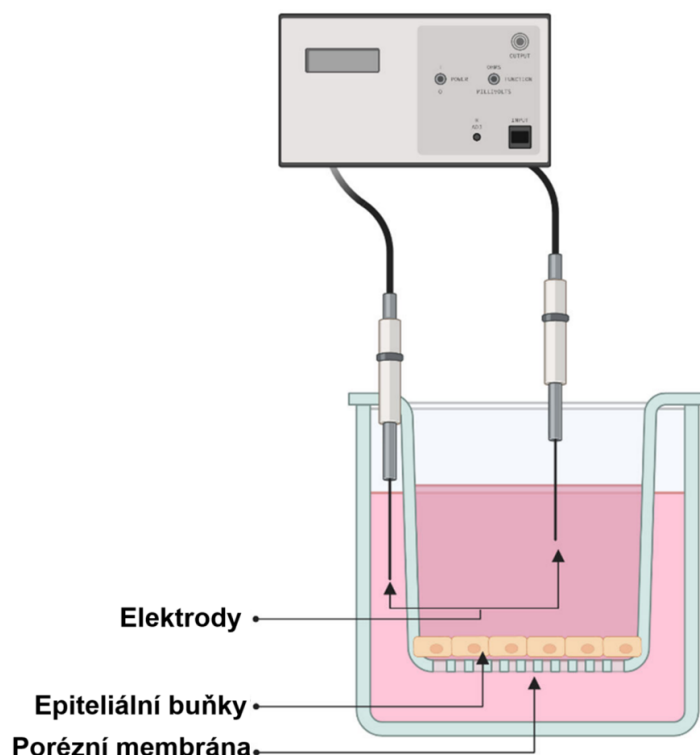
#### **4.2.5 Monitorování transportu testovaných sloučenin přes hematoencefalickou bariéru**

Hematoencefalická bariéra (BBB; blood-brain barrier) je aktivní rozhraní oddělující centrální nervový systém (CNS) a oběhový systém (Obrázek 16), která omezuje transport různých látek mezi dvěma kompartmenty a hraje klíčovou roli při udržování homeostázy v CNS [104]. Fyziologicky se BBB skládá ze složité sítě vaskulárních endotelových buněk (BMEC), které tvoří endotel s fyzikální (těsné spoje) a biochemickou (enzymové) bariérou [105]. Pro endotel BBB je charakteristická absence fenestrace a přítomnost těsných spojení, složených z transmembránových proteinů (claudin, okcludin a junkčních adhezních molekul) a cytoplazmatických proteinů. Těsná spojení jsou mezibuněčné spojení, která regulují difúzi, řídí transportní procesy pro udržení homeostázy a omezují prostup potenciálně toxických látek z krve do mozku. Integrita BBB bariéry je zároveň životně důležitá pro fyziologické aktivity tkáně. Ovšem tato fyzická bariéra zároveň omezuje průchod většiny chemoterapeutických léků, čímž představuje zásadní problém pro chemoterapii mozkových nádorů [106]. Pro studium a predikci mechanismů absorpce léčiv, transportních drah a účinků sloučenin na funkci bariéry byly vytvořeny různé modely BBB, které umožňují podrobné screeniny léků *in vitro*. Při posuzování spolehlivosti buněčného modelu BBB jsou především hodnoceny jeho vlastnosti, jako polarizace, snížená permeabilita, exprese endoteliálních markerů a proteinů. V současné době se pro formování modelu BBB využívají především lidské buněčné linie hCMEC/D3, hBMEC a indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC) po specifické diferenciaci [104], [107].



Obrázek 16: Schéma hematoencefalické bariéry. Převzato a upraveno z [108].

Jednou z nejčastěji používaných *in vitro* technik pro hodnocení modelu BBB je transepiteliální/transendoteliální elektrický odpor (TEER). Jedná se o široce používanou metodu hodnocení a monitorování epiteliální tkáň v oblastech biologických věd a terapeutického vývoje. TEER patří mezi impedimetrické techniky, které jsou založené na měření změn v impedanci (elektrickém odporu). Tato metoda představuje neinvazivní a nedestruktivní způsob umožňující hodnocení integrity a propustnosti buněčné bariéry v reálném čase a může být použita pro transport různých toxických látek nebo farmak přes membránu [109]. Pro měření elektrického odporu byl použit monitorovací systém ECIS (z angl. Electric Cell-substrate impedance sensing). Systém ECIS využívá dvě elektrody umístěny z obou stran buněčné monovrstvy na porézním nosiči (Obrázek 17). Při měření je aplikován do systému nízkofrekvenční střídavý proud a čidlo měří změnu elektrického signálu po průchodu buněčnou vrstvou [110]. Pro BBB model je charakteristická vysoká hodnota TEER, která je typická pro neporušené buněčné vrstvy a naznačuje omezenou permeabilitu iontů a molekul (tj. nízkou vodivost). Nízké hodnoty TEER naznačují zvýšenou propustnost, která souvisí s narušenou bariérovou funkcí buněčné monovrstvy. Měření impedance poskytuje kvantitativní informace o propustnosti látek přes tkáňovou bariéru a hodnocení funkce epiteliální bariéry.



Obrázek 17: Schématické znázornění analýzy TEER. Převzato a upraveno z [111].

### Pracovní postup

Pro studium prostupu testovaných komplexů přes hematoencefalickou bariéru byly vytvořeny modely BBB z buněk hCMEC/D3. Buňky hCMEC/D3 byly kultivovány na matrici kolagenu typu I v EGM–2 MV v médiu pro růst mikrovaskulárních endoteliálních buněk obohaceném o růstové faktory. Před zahájením samotného formování BBB modelu byly do 24jambkové destičky vloženy 0,33 cm<sup>2</sup> Cell culture Inserts s velikostí pórů 3 μm (Falcon). Do insertu bylo napipetováno po kapkách 300 μl připraveného 20x zředěného roztoku kolagenu typu I, připraveného přidáním 0,5 ml kolagenu do 9,5 ml vychlazeného PBS, který se nechal po 1 hodinu tuhnout v inkubátoru při 37 °C. V mezidobě bylo připraveno kultivační médium do 50 ml falkonky doplněním 50 ml EGM<sup>TM</sup> 2 MV media 2,5 ml 5% fetálního bovinního séra (FBS; Lonza, Švýcarsko, 5 %), 50 μl epidermálního růstového faktoru (hEGF; Lonza, Švýcarsko, 5 ng/ml), 200 μl fibroblastového růstového faktoru (hFGF; Lonza, Švýcarsko, 5 ng/ml), 50 μl vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (hVEGF; Lonza, Švýcarsko, 5 ng/ml), 50 μl rekombinantního růstového faktoru lidského inzulinu (Insulin-like growth factor, R3–IGF–1; Lonza, Švýcarsko, 15 ng/ml), 50 μl kyseliny askorbové (Lonza, Švýcarsko, 50 μg/ml), 20 μl hydrokortisonu (Lonza, Švýcarsko, 1 μg/ml) a 50 μl směsi gentamicin/amfotericin (GA–1000; Lonza, Švýcarsko). Následně bylo z kultivační nádoby odsáto původní médium, kultura byla dvakrát opláchnuta 2 ml PBS a trypsinizována 2 ml 10x zředěného roztoku Trypsinu, který se nechal působit 3 minuty. Poté byly buňky sklizeny do 15 ml falkonky s 2 ml média a odstředěny na centrifuzě (250 g, 3 min, 23 °C). Supernatant nad usazeným buněčným peletem se odsál. K buňkám se přidalo 5 ml plně suplementovaného EGM<sup>TM</sup> 2 MV media. Před nasazením buněk bylo do jamek pod vloženými inserty napipetováno 800 μl EGM<sup>TM</sup> 2 MV média a přebytečná tekutina kolagenové

vrstvy byla z insertu odstraněna jeho převrácením nad sterilní čistou buničinu. Insert byl poté vložen do jamky s médiem a po kapkách na něj bylo opatrně přeneseno pipetou 300  $\mu\text{l}$  buněčné směsi. Buňky byly pro formování BBB modelu nasazeny v hustotě 20000 buněk na jamku 24jamkové destičky s vloženými inzerty. Buňky byly kultivovány po dobu 7–10 dní, během kterých došlo k vytvoření účinné bariéry. Přičemž každé dva dny jim bylo vyměněno původní médium za čerstvé (jak pod insertem, tak v insertu).

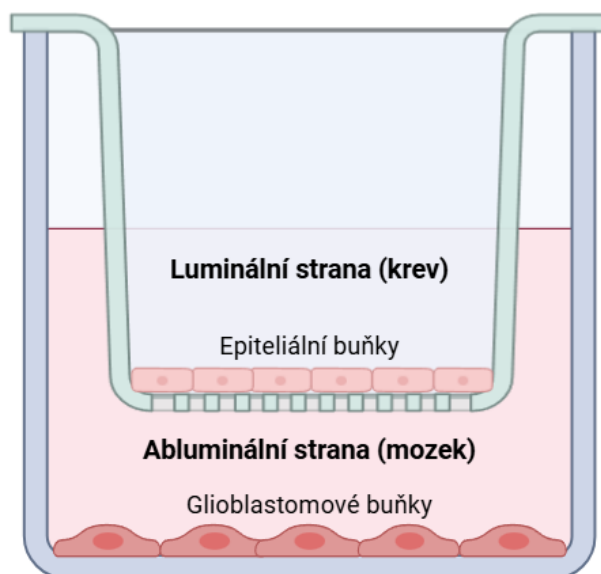
Bariérová funkce byla stanovena měřením transepiteliálního elektrického odporu (TEER). Inzerty s diferencovanými buňkami byly spolu se třemi inserty bez buněk (kontrola) přesunuty do černé 24jamkové destičky se zlatými elektrodami (24-well TEER array) pro TEER analýzu. Do jamky pod inserty bylo napipetováno 800  $\mu\text{l}$  média a 300  $\mu\text{l}$  média se napipetovalo do insertu s/i bez buněčné vrstvy. Destička byla následně ekvilibrována pro ustálení kontaktu mezi médiem a elektrodami. Dále byly nastaveny parametry experimentu (časové intervaly měření odporu v systému; 20 min) a byly naměřeny hodnoty pozadí, tedy impedance pro model BBB s médiem. Modely byly kultivovány do druhého dne za fyziologických podmínek (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) pro stabilizaci buněčné kultury. Poté bylo k médiu přidáno 100  $\mu\text{l}$  vybraných testovaných sloučenin (Ir3, Ir4 a Ir5; koncentrace zásobních roztoků  $\sim 5 \text{ mM}$ ) o finální koncentraci 10  $\mu\text{M}$  (dříve naředěno médiem) a bylo zahájeno měření impedance, která byla monitorována po dobu 24 hodin v termostatu (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Koncentrace studovaných sloučenin iridia byla analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP–MS). Koeficienty permeability ( $P_{app}$ ) byly vypočteny pomocí vzorce:

$$P_{app} = \left( \frac{dC}{dt} \right) \cdot \left( \frac{V_r}{A \cdot C_0} \right), \quad (1)$$

$dC/dt$  představuje kumulativní koncentraci odpovídající komplexům iridia v průběhu času v bazolaterálním kompartmentu,  $V_r$  je objem (1,5 ml),  $A$  je povrchová plocha inzertu (0,336  $\text{cm}^2$ ) a  $C_0$  je počáteční aplikovaná koncentrace sloučeniny.

#### **4.2.6 Kokultivační model BBB s buňkami U87MG s následnou analýzou buněčné akumulace.**

Po průniku protirakovinných sloučenin přes hematoencefalickou bariérou (BBB) je pro jejich účinnost při léčbě mozkových nádorů a metastáz rozhodujícím faktorem buněčný příjem/akumulace aplikované látky [112], [113]. Buněčný příjem neboli akumulace komplexů představuje klíčovou vlastnost v mechanismu působení protinádorově aktivních farmak. Tato charakteristika jednoznačně stanovuje efektivitu cytostatik vůči nádorovým buňkám. Sloučeniny s nízkou schopností penetrovat přes cytoplasmatickou membránu bývají zpravidla méně účinné, a hrozí u nich vznik získané rezistence [114]. Pro studium schopnosti látek pronikat do nitra nádorových buněk byly vytvořeny kokulturní modely BBB, složené ze dvou modelových buněčných linií (Obrázek 18).



Obrázek 18: Schéma kokultivačního modelu BBB složeného z buněk hCMEC/D3 umístěných v apikálních částí a buněk U87MG v bazolaterální části systému. Převzato a upraveno z [115].

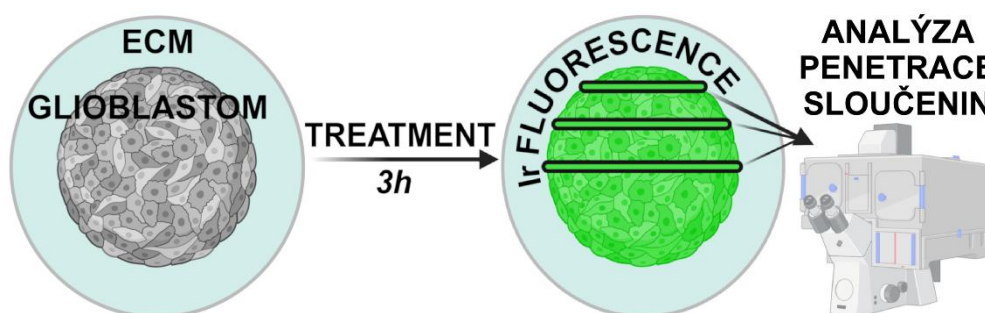
### Pracovní postup

Pro potvrzení cíleného působení a akumulace testovaných sloučenin v glioblastomových buňkách U87MG, byl vytvořen model pro monitorování buněčného příjmu ze dvou linií U87MG a hCMEC/D3. Dříve sklizené glioblastomové buňky U87MG byly nasazeny do bazolaterálních částí jamek 24jamkové destičky v hustotě  $1 \cdot 10^5$  buněk na jamku a kultivovány přes noc. Do apikálních částí modelových systémů byly následně vloženy inserty s vytvořenými BBB bariérami z buněk hCMEC/D3. Takto připravený systém byl ošetřen komplexem Ir4 o finální koncentraci  $10 \mu\text{M}$ . Komplex byl aplikován do apikálních částí již sestavených modelů. Po aplikaci komplexů byly modelové systémy inkubovány 24 hodin za fyziologických podmínek. Následně od sebe byly apikální a bazolaterální části odděleny. Každý buněčný model byl opláchnut PBS ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ), tripsinizován. Buňky byly sesbírány, dvakrát promyty studeným PBS a spočítány automatickou počítačkou Biorad TC10. Poté byly buňky centrifugovány při 300 g, 3 minuty při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  ve dvou cyklech, při kterých se eliminovalo zbytkové množství extracelulárně přítomné testované sloučeniny. Získané buněčné pelety vzorků byly mineralizovány roztokem ultračisté kyseliny chlorovodíkové (5 M) po dobu 24 hodin za vzniku plně homogenního roztoku. Takto připravené roztoky byly naředěny pro snížení koncentrace kyseliny (doporučená koncentrace HCl pro měření na ICP–MS je do 5%). Konečný obsah iridia absorbovaného buňkami byl stanoven pomocí ICP–MS. Experimenty byly provedeny ve třech opakováních. Získaná data byla vyjádřena v nanogramech iridia na jeden milion buněk.

#### 4.2.7 Distribuce zkoumaných komplexů iridia ve sféroidech glioblastomu U87MG

Většina slibných preklinických léků nemá bohužel u skutečných pacientů s nádory žádnou nebo jen slabou účinnost. Hlavním důvodem zkreslené úspěšnosti potencionálních chemoterapeutik je nízká fyziologická podobnost hojně využívaných 2D jednovrstvých

buněčných kultur se zvířecími modely [116]. Mnohobuněčné sféroidy napodobují mikroprostředí a tkáňové vlastnosti nádorů *in vivo* [117]. Tento systém poskytuje vhodný model pro studium penetrace léčiv, metabolismu a distribuce léčiv v rámci solidních nádorů. Získané informace umožňují predikovat účinnost léčby nebo vznik rezistence nádorů vůči aplikované léčbě [116]. Důležité je poznamenat, že citlivost a invazivita *in vivo* nádoru je zásadně ovlivněna interakcemi buňka–buňka a buňka–extracelulární matrice (ECM) [118]. Extracelulární matrix je nebuněčná část nádorového mikroprostředí, která tvoří biologickou a fyzickou bariéru bránící účinnému pronikání léčiv do tumoru [119]. Ve výsledku zvyšuje ECM rezistenci nádoru vůči aplikované terapii [50]. Z tohoto důvodu byly vyvinuty nové terapeutické strategie zaměřené nejen na samotnou malignitu, ale také na mikroprostředí ovlivňující nádor [119]. Pro získání věrohodnějších výsledků byla distribuce testovaných sloučenin stanovena ve složitějším modelu sferoidu zapuštěného do matrice Matrigel.



Obrázek 19: Schéma postupu měření distribuce aplikovaných komplexů pomocí konfokálního mikroskopu.

### Pracovní postup

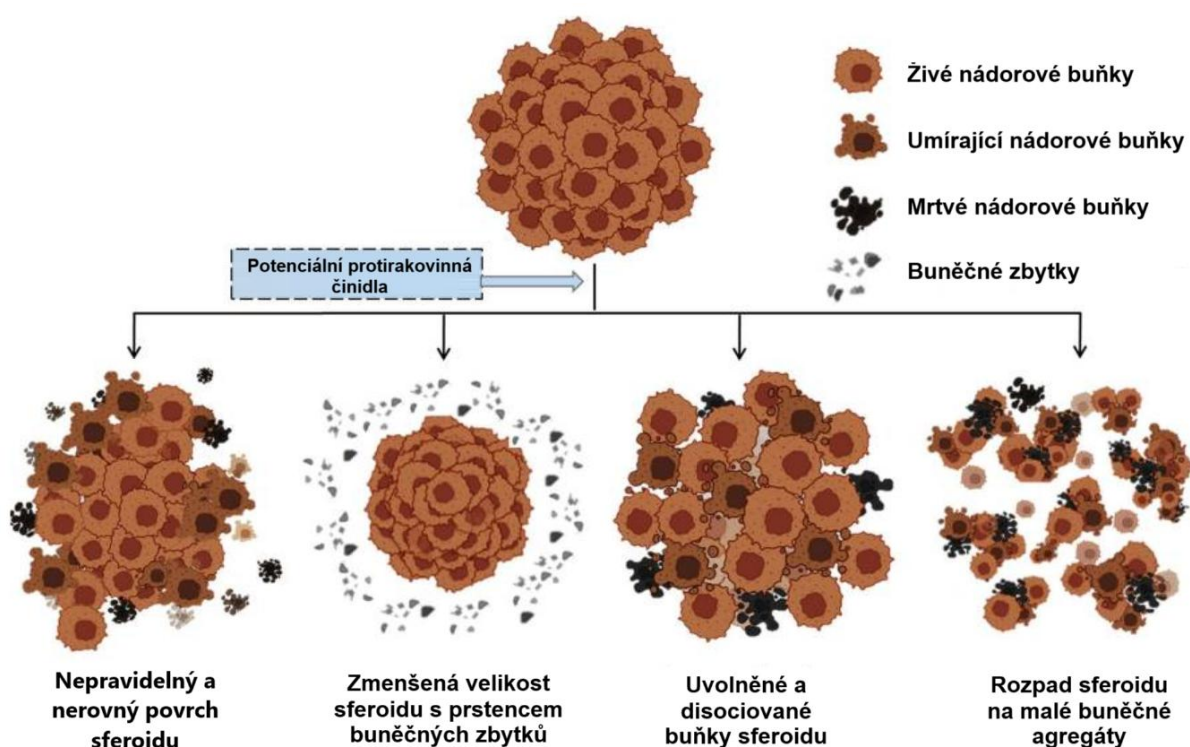
Sféroidy vytvořené z buněk U87MG pomocí ULA 96-jamkových destiček v médiu DMEM–F12 doplněném růstovými faktory byly po 72hodinovém formování zapuštěny do 15  $\mu$ l matrice Matrigel, která se nechala po dobu 30 minut gelovatět. Poté byly sféroidy kultivovány dalších 24 hodin v konfokálních Petriho miskách (Mattek) s 1 ml 3D formovacího média. Po ukončení kultivace byly vzorky vystaveny po dobu 3 hodin působení vybraných studovaných komplexů Ir3, Ir4 a Ir5 (5  $\mu$ M). Po uplynutí časového intervalu bylo původní médium odsáno, vzorky byly opláchnuty PBS a přeneseny do čerstvého 3D formovacího média. Fluorescence testovaných sloučenin byla vizualizovaná a analyzovaná v definovaných vrstvách pomocí konfokálního mikroskopu (Leica CM SP8 SMD, Leica, Německo) (Obrázek 19).

#### 4.2.8 Hodnocení buněčné odpovědi 3D sferoidů na studované komplexy

Nádorové sféroidy patří mezi dobře charakterizované 3D kultivační systémy, které se podobají fyziologicky i strukturně nádorové tkáni [120]. Mají široké uplatnění v řadě aplikací, včetně screeningu protirakovinných léků s antiproliferativními vlastnostmi, hodnocení cytotoxicity, schopnosti léčiv pronikat nádorem a zkoumání mechanismu protirakovinného účinku sloučenin. Účinnost testovaných potencionálních protirakovinných léčiv v 3D sféroidních modelech může být hodnocena pomocí biochemických testů, technik barvení a změn morfologických parametrů [121].

#### 4.2.8.1 Analýza morfologických parametrů sféroidů po aplikaci testovaných sloučenin v kombinaci s fotodynamickou terapií

Pozorování morfologických změn sféroidů vyvolaných protirakovinnými léky představují jednoduchý, spolehlivý a efektivní způsob určení účinnosti testovaných látek [121]. Mezi základní hodnocené morfologické parametry patří velikost, tvar, objem, průměr, plocha, obvod, kompaktnost a sféricita 3D modelu [120]. Jedná se především o prvotní pozorovatelné znaky, které lze vyhodnotit pouze pomocí světelné mikroskopie a nevyžadují žádné specifické barvení nebo sondy. Morfologické změny způsobené úspěšnou protirakovinnou léčbou u 3D nádorových sféroidů, jako je zmenšená velikost, ztráta kompaktnosti, integrity nebo hladkého povrchu sféroidů, jsou vysoce spolehlivé charakteristiky typické pro léčiva působící cytotoxicky, antiproliferativně nebo anti-metastaticky (Obrázek 20). Tato metoda může významně snížit potřebu biochemických testů a technik barvení [121].



Obrázek 20: Schéma morfolozických změn 3D nádorových sféroidech v reakci na cytotoxicitu/antiproliferativní aktivitu vyvolanou léčivem. Převzato a upraveno z [121].

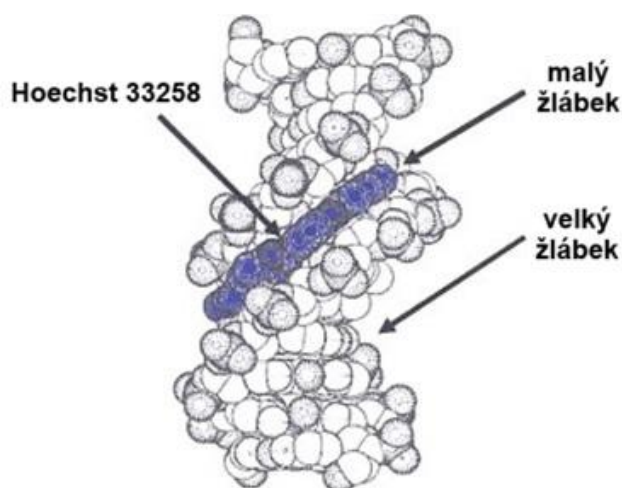
#### Pracovní postup

Pro tento experiment byly vytvořeny dvě sady vzorků, které byly buď vystaveny záření nebo ponechány ve tmě. Sféroidy byly připraveny z buněk U87MG 72hodinovou inkubací za 3D podmínek pomocí ULA 96-jamkových destiček v médiu DMEM-F12 doplněném růstovými faktory podporující tvorbu sféroidů. Po 72hodinovém formování byly sféroidy ošetřeny zkoumanými iridiovými komplexy Ir1-Ir10 o konečné koncentraci odpovídající  $IC_{50}$  a temozolomidem (TMZ; finální koncentraci  $100 \mu\text{M}$ ). Sféroidy byly ko-kultivovány s testovanými sloučeninami po dobu 90 minut v inkubátoru. Následně byla jedna sada vzorků ozářena modrým světlem o vlnové délce  $420 \text{ nm}$  ( $58 \text{ Wm}^{-2}$ ) po dobu 30 minut. Druhá sada

vzorků byla ponechána ve tmě (neozářena). Po ukončení treatmentu bylo odstraněno médium, vzorky byly opláchnuty a inkubovány dalších 72 hodin v 3D formovacím médiu bez léčiv. Morfologické parametry sferoidů byly od počátku jejich formování až do ukončení experimentu (72 hodin před ošetřením; 72 hodin po ošetření; 144 hodin celkem) pravidelně v intervalu 24 hodin monitorovány a hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem.

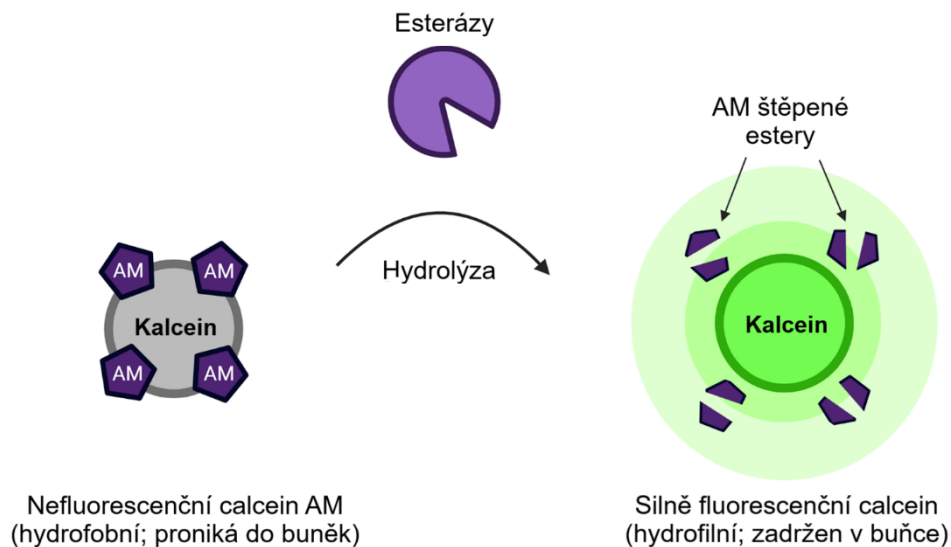
#### 4.2.8.2 Stanovení metabolické aktivity sferoidů ošetřených zkoumanými komplexy v kombinaci s fotodynamickou terapií

Biochemické testy a techniky barvení představují další možnost pro hodnocení účinnosti látek aplikovaných na sféroidy. Tyto metody jsou založené na reakci barviva nebo fluorescenční sondy s určitými molekulami produkovanými buňkami nebo s makromolekulami obsaženými v rozrušených sféroidech (DNA) (Obrázek 21). Tyto zobrazovací metody analyzují intenzitu luminiscence nebo fluorescence aplikovaného fluorochromu detekovaného pomocí čtečky destiček. Nejčastěji se využívají při kvantifikaci viability buněk (propidium jodid, Kalcein AM, ethidium homodimer), určení specifického typu buněčné smrti (Annexin V) nebo v případě imunohistochemie pro značení unikátních markerů. Mezi tyto přístupy se řadí také testy buněčné životaschopnosti stanovené pomocí trypanové modři, Perfecta 3D nebo CellTiter-Glo 3D [121].



Obrázek 21: 3D schéma navázání barviva Hoechst do DNA struktury. Převzato a upraveno z [122].

V naší práci byly využity 3 fluorescenční sody, a to o Kalcein AM, propidium jodid a Hoechst 33258 [123]. Propidium jodid je široce používaný fluorochrom, který selektivně proniká do buněk s narušenou cytoplazmatickou membránou, kde se váže na DNA nebo RNA a umožňuje detekci mrtvých buněk [124]. Pro analýzu metabolicky aktivních (živých) buněk byl použit Kalcein AM (calcein-acetomethoxy), který proniká do buněk ve formě nefluorescenčního derivátu, z kterého esterázy v živých buňkách odštěpí acetomethoxy skupiny (Obrázek 22). Produktem této reakce je silně zeleně fluorescenční kalcein, který neprochází ven z buněk [125]. Hoechstova barviva tvoří skupinu modrých fluorescenčních barviv, která se váží na DNA. Toto barvení bylo použito pro přesné vytyčení obrysů sféroиду [126].



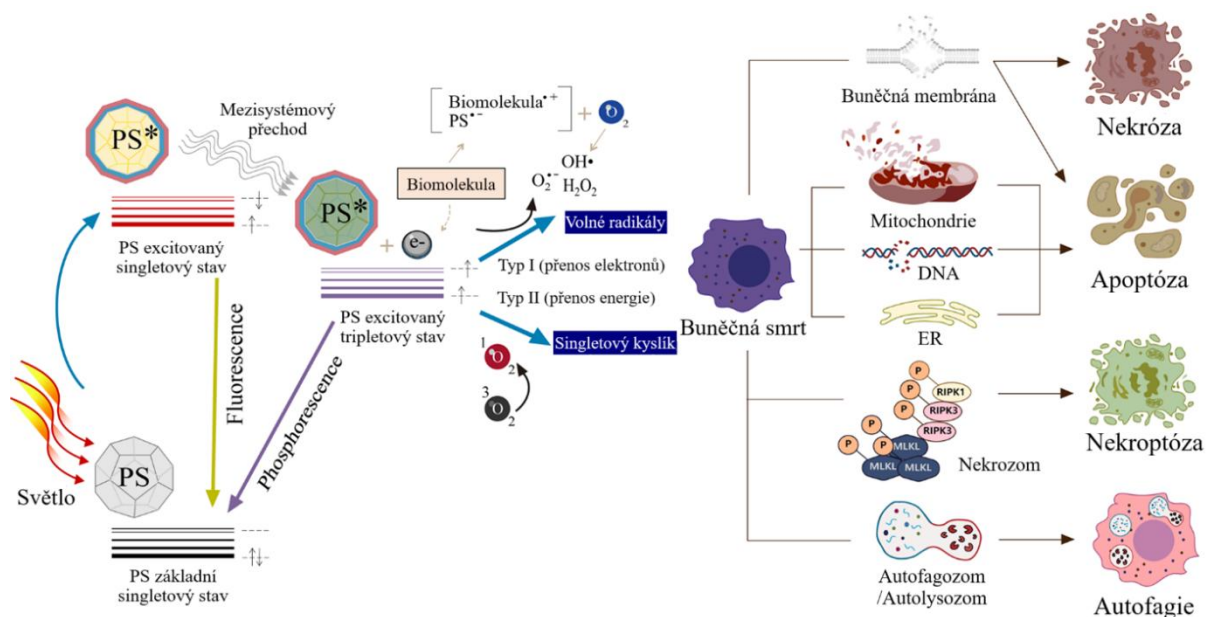
Obrázek 22: Princip analýzy metabolické aktivity pomocí sondy Kalcein AM. Převzato a upraveno z [127].

### Pracovní postup

Z buněk U87MG byly vytvořeny sferoidy 72hodinovou inkubací za 3D podmínek pomocí ULA 96-jamkových destiček v médiu DMEM–F12 doplněném růstovými faktory. Po 72hodinovém formování byly sferoidy zapuštěny do 15  $\mu$ l matrice Matrigel a matrice se nechala po dobu 30 minut gelovatět. Následně byly sferoidy přeneseny do konfokálních Petriho misek (Mattek) s 1 ml 3D formovacího média, ve kterých byly po dobu 24 hodin kultivovány. Poté byly vzorky ošetřeny vybranými testovanými sloučeninami Ir3, Ir4 a Ir5 v koncentracích odpovídajících  $IC_{50}$  stanovených pro 3D kultury po dobu 3 hodin. Po ukončení treatmentu byla jedna sada vzorků ponechána ve tmě a druhá byla ozářena laserem o vlnové délce 405 nm (1 mW) po dobu 60 s. Z obou sad vzorků bylo poté odstraněno médium, vzorky byly opláchnuty a přeneseny do čerstvého 3D formovacího média bez komplexů. V tomto stavu byly kultivovány dalších 24 hodin. Po ukončení inkubace byly vzorky (jak ozářené, tak kontroly inkubované ve tmě) barveny Hoechst 33258 (20  $\mu$ g/ml), Kalceinem AM (2  $\mu$ M) a propidium jodidem (8  $\mu$ g/ml) po dobu 2 hodin. Vzorky byly následně postupně vizualizovány pomocí konfokálního mikroskopu (Leica CM SP8 SMD, Leica, Německo). Zobrazování bylo prováděno v 10 skenech v definovaných vrstvách s krokem 20  $\mu$ m. Jednotlivé intenzity fluorescence byly zachyceny a analyzovány pomocí softwaru. Měření bylo provedeno ve třech nezávislých experimentech.

#### 4.2.9 Detekce reaktivních forem kyslíku ve sféroidech U87MG

Reaktivní formy kyslíku (ROS) hrají zásadní roli ve fotodynamické terapii (PDT). Při PDT dochází k aktivaci fotocitlivé látky (fotosenzitizéru) světelným zdrojem, která indukuje tvorbu ROS z atomárního kyslíku v cíleně ozářených buňkách a následnou buněčnou smrt (Obrázek 23). Tato metoda nabízí mnoho výhod, jako je minimální systémová toxicita, cílená léčba rakoviny a překonání mnohočetné lékové rezistence [128].



Obrázek 23: Princip fotodynamické terapie. Převzato a upraveno z [129].

Pro stanovení hladiny ROS v nitru buněk se používá řada známých postupů (např. 2',7'-dichlorofluorescein diacetát) [130]. V této práci byla pro stanovení množství volných kyslíkových radikálů, konkrétně pro detekci hydroxylových radikálů ( $\bullet\text{OH}$ ) a superoxidových aniontů ( $\text{O}_2^-$ ) [131], využita fluorescenční sonda CellROX™ Green, která proniká do buňky v redukovaném stavu. V přítomnosti ROS podléhá toto činidlo oxidaci, která vede k iniciaci fluorescence. Fluorescenční signál je možné detekovat na fluorimetru, popřípadě s pomocí konfokální mikroskopie či průtokové cytometrie. Míra fluorescence je přímo úměrná množství vznikajících volných radikálů [132].

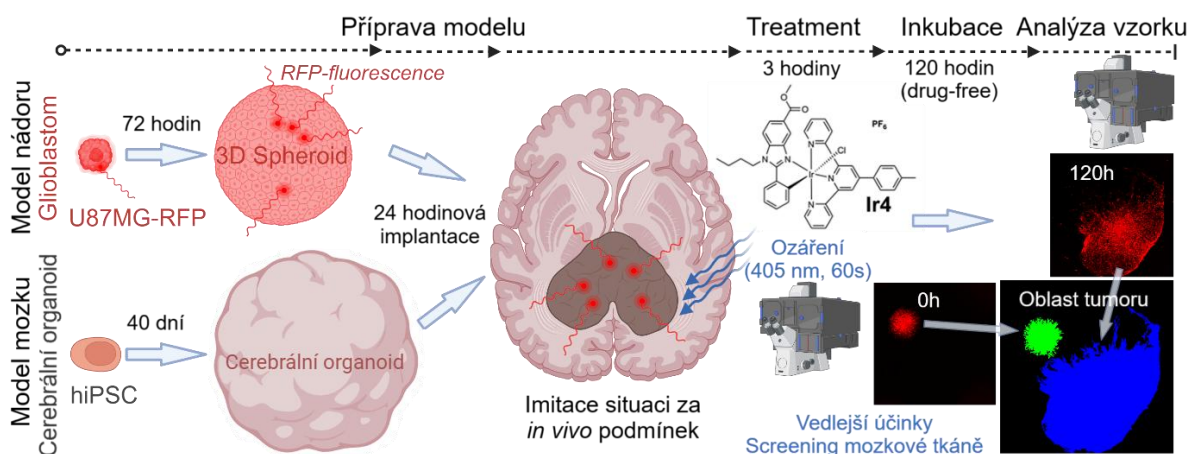
### Pracovní postup

Dříve připravené sféroidy glioblastomu U87MG (3000 buněk/jamku) byly ošetřeny komplexem Ir4 v koncentraci odpovídající  $\text{IC}_{50}$  stanovené pro 3D kultury nebo udržovány za podmínek bez léčiva (kontroly) po dobu 3 hodin. Poté byly vzorky barveny po dobu 30 minut fluorescenční sondou CellRox Green® (ThermoFisher Sci.) o finální koncentraci  $5\ \mu\text{M}$  a propidium jodidem ( $8\ \mu\text{l/ml}$ ). Následně byly sféroidy ozařovány po dobu 60 s modrým laserem ( $405\ \text{nm}$ ,  $1\ \text{mW}$ ). Vzorky byly skenovány pomocí konfokálního mikroskopu (Leica CM SP8 SMD, Leica, Německo) v jednotlivých vrstvách (10 vrstev s krokem  $20\ \mu\text{m}$ ). Zobrazování vzorků bylo prováděno před a bezprostředně po ozáření (1 min po ozáření) a poté v definovaných časových intervalech po ozáření (15 a 30 min). Jednotlivé intenzity fluorescence byly zachyceny a analyzovány pomocí softwaru. Experiment byl nezávisle replikován v triplicátu.

#### 4.2.10 Příprava modelu implantátu sféroid-organoid pro přesnější charakterizaci mechanismu působení Ir4 komplexu

Mozkové organoidy představují jedinečnou platformu pro studium účinků široké škály sloučenin nebo podmínek na zdravé nebo nemocné tkáni odvozené z člověka [133]. Tento model umožňuje studium za podmínek fyziologicky velmi blízkých *in vivo* situaci, avšak

v podmínkách *in vitro* [134]. V současné době mají organoidy veliký potenciál pro modelování neurovývojových poruch, neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba) [133] a mozkových nádorů (glioblastom). Cerebrální nádorové organoidy pak nalézají využití při studiu nádorového mikroprostředí a při hodnocení screeningu potenciálních protirakovinných látek [135]. Cílem v tomto experimentu bylo připravit fúzní systémy [136], složené ze zdravé a maligní tkáně (Obrázek 24), za účelem testování studovaných komplexů.



Obrázek 24: Schéma postupu implantace sferoidu do organoidu.

#### 4.2.10.1 Studium distribuce komplexu Ir4 ve fúzním systému

Pro studium monitorování distribuce vybraného kandidátního komplexu Ir4 v organismu pacienta byl vytvořen model fúzního implantátu. Tento implantát se skládal z nádoru, reprezentovaném implantovanými nádorovými sferoidy generovanými z buněk U87MG, a zdravé tkáně, představované cerebrálním organoidem vytvořeným z hiPSC.

Před samotnou implantací byly nejdříve výše zmíněné 3D modely vytvořeny a standardizovány. Sféroidy byly připraveny z buněk glioblastomu U87MG 72hodinovou kultivací za 3D podmínek pomocí ULA 96jamkových destiček v médiu DMEM-F12 obohaceném o 2% B27, epidermálním růstovým faktorem (EGF; 20 ng·ml<sup>-1</sup>), fibroblastový růstový faktor 2 (FGF2; 10 ng·ml<sup>-1</sup>) a BSA (0,15 %). Mozkové organoidy byly generovány pomocí čtyřstupňové diferenciaci z hiPSC za pomoci ULA destiček v prostředí Stemdiff cerebrální organoidové sady (StemCell Technologies, CA)

Z těchto modelových systémů byl po úplném dozrání mozkových organoidů (přibližně 35 dnů) a definované době růstu sféroidů (72 h) připraven systém fúzního implantátu. Nejprve byl Matrigelový obal organoidu chemicky rozrušen přidáním 200 µl roztoku CellRecovery® (Corning), celý proces probíhal po dobu 20 minut na ledu. Následně byly sféroidy a organoidy bez Matrigelu přesunuty pomocí pipety s vychlazenými špičkami na silikonový povrch pro přiblížení 3D struktur (Organoid Embedding Sheet; Stemcell Technologies) do sterilní misky o průměru 100 mm. Z okolí vzorků bylo odstraněno médium, obě entity byly manuálně přiblíženy blízko k sobě a pomocí pipety s vychlazenými špičkami byly společně přiblížené 3D modely zapuštěny do 15 µl matrice Matrigel (Corning). Poté se miska umístila do inkubátoru na 30 minut, během kterých Matrigel® polymerizoval. Po úplném zgelování matrice byl

každý implantát přemístěn do jamky 24-jamkové ULA destičky s 500  $\mu$ l maturačního organoidního média (dříve připravené médium obsahující 6 ml STEMdiff™ cerebrálního organoidního bazálního média 2, 120  $\mu$ l STEMdiff™ cerebrálního organoidního supplementu E a 5  $\mu$ l Gentamycinu). Modely implantátů byly poté zkontrolovány pod mikroskopem s fázovým kontrastem a kultivovány po dobu 24 hodin.

Následně byly fúzní systémy ošetřeny 5  $\mu$ M Ir4 a ko–inkubovány po dobu 3 hodin, pro úplnou distribuci testovaného komplexu jak do zdravé, tak do maligní tkáně. Vzorky byly poté přeneseny do konfokálních Petriho misek obsahujících médium pro cerebrální zrání bez léčiv a analyzovány pomocí konfokálního mikroskopu (Leica CM SP5, Leica, Německo).

#### **4.2.10.2 Účinky léčby Ir4 v kombinaci s fotodynamickou terapií na modelu implantátu cerebrálního organoid-glioblastom.**

Modely implantátů byly připraveny stejným způsobem, jak je popsáno v předchozím experimentu. Po 24hodinové inkubaci byly modely implantátů ošetřeny po dobu 3 hodin ekvitoxickou koncentrací testované sloučeniny Ir4 odpovídající  $IC_{50,72h}$  stanovené pro 3D sferoidy. Následně byla nádorová oblast implantace, sféroid U87MG, ozářena po dobu 30 sekund modrým laserem (405 nm, 1 mW) pomocí konfokálního mikroskopu Leica CM SP5 (Leica, Německo). Po ozáření bylo implantátům vyměněno médium a systémy byly udržovány za podmínek bez léčiva po dobu 120 hodin. Vzorky byly dále barveny po dobu 2 hodin pomocí Hoechst 33258 (20  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>), Kalcein AM (2  $\mu$ M) a PI (8  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>). Posléze byly vzorky zobrazeny a hodnoceny pomocí konfokálního mikroskopu Leica CM SP5.

#### **4.2.10.3 Analýza růstu a migrace glioblastomu do zdravé tkáně po aplikované léčbě komplexem Ir4 v kombinaci s ozařováním**

Pro monitorování lokalizace, růstu, migrace a invazivity glioblastomu byly vytvořené speciální fúzní systémy složené z mozkových organoidů s implantovanými sferoidy z buněk U87MG-RFP. Jedná se o buněčnou linii lidského glioblastomu trvale exprimující červený fluorescenční protein (RFP).

Připravené sferoidy (72 h; DMEM–F12 médium) byly implantovány do mozkových organoidů (40 dnů) zdravé tkáně a společně zapuštěny do matrice Matrigel (Corning). Vytvořené fúzní modely byly kultivovány po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky buď ošetřeny 2  $\mu$ M sloučeninou Ir4, 100  $\mu$ M temozolomidem, nebo ponechány bez ošetření po dobu 3 hodin. Následně byl analyzován pomocí konfokální mikroskopie počáteční stav všech implantátů. Po 3–hodinové ko–inkubaci s testovanými sloučeninami byly vybrané vzorky ozářeny modrým laserovým světlem (405 nm, 60 s, 1 mW). Vzorky byly přeneseny do čerstvého média (bez léčiva) a kultivovány po dobu 120 hodin. Závěrečná vizualizace a analýza vzorků byla provedena pomocí konfokálního mikroskopu (Leica CM SP5, Leica, Německo).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Antiproliferativní aktivita

Antiproliferativní aktivita komplexů patří mezi počáteční charakteristiky potenciálních protirakovinných sloučenin, podle níž se hodnotí a vybírají kandidáti na budoucí léčiva na základě schopnosti testovaných látek cytotoxicky či cytostaticky působit na cílovou nádorovou buněčnou kulturu [91], [92]. Zároveň také napomáhá odhalit jejich mechanismus účinku. Cílem tohoto experimentu bylo nejen stanovit cytotoxicitu, ale současně prokázat selektivitu testovaných komplexů, která by byla závislá na aktivaci samotné látky specifickým druhem záření [97], [98]. Proto byla studie provedena vedle klasických (ve tmě) také za specifických podmínek (po ozáření modrým světlem) pro stanovení tzv. fototoxicity studovaných sloučenin. Absorpční spektra studovaných komplexů byla již dříve publikována, a proto zde nejsou uvedeny [66].

Pro tuto studii byla vybrána jedna nádorová buněčná linie, konkrétně se jednalo o buňky glioblastomu U87MG [137], [138]. Je důležité zmínit, že výsledky získané z klasických 2D *in vitro* experimentů nejsou bohužel plně reprezentativní pro klinické prostředí. Z tohoto důvodu byly porovnány s relevantnějšími experimenty provedenými na 3D sféroidních modelech, které poskytují fyziologicky věrohodnější informace o celkové aktivitě studovaných komplexů proti maligním tkáním v organismu pacienta [139]. Z tohoto důvodu byla antiproliferativní aktivita zkoumaných sloučenin hodnocena nejen na 2D buněčné kultuře, ale také na 3D sféroidních modelech.

Připravené vzorky byly preinkubovány s aplikovanými testovanými komplexy po dobu 1,5 h ve tmě a následně byla jedna sada vzorků po dobu 30 minut ozářena modrým světlem (420 nm, 58 Wm<sup>-2</sup>), zatímco druhá kontrolní sada byla ponechána ve tmě. Buňky byly poté inkubovány po dobu 70 hodin ve „drug free“ stavu. Antiproliferativní aktivita komplexů v této práci byla stanovena pro 2D buněčné kultury pomocí konvenčního SRB testu, který je založený na měření obsahu buněčných proteinů, a v případě generovaných nádorových sferoidů byla určena pomocí testu CellTiterGlo-3D (Promega), který umožňuje měření množství ATP. Při stanovení byly tedy využity dvě metody založené na odlišném principu stanovení životaschopnosti. V případě testu SRB není vyžadovaná metabolická přeměna sloučenin na produkt pro určení živých buněk. Ovšem v případě metody CellTiterGlo-3D je nutná metabolická aktivita buněk, která produkuje molekuly ATP využívané luciferázou při oxidaci luciferinu na excitovanou molekulu oxyluciferinu, která emituje viditelné světlo při přechodu do základního stavu. Na základě výsledků těchto metod byly stanoveny hodnoty IC<sub>50</sub>, které určují koncentraci studované látky, jež je nutná k dosažení 50% inhibice proliferace nádorových buněk. Pro srovnání výsledků byly provedeny také identické testy s klinicky schváleným protinádorovým léčivem Temozolomid. Dále byl vypočten index fototoxicity (FI) (viz. rovnice (2)) a index nádorové hmoty (TMI) (viz. rovnice (3)).

$$FI = \frac{IC_{50,tma}}{IC_{50,420\text{ nm}}} \quad (2)$$

$$TMI = \frac{IC_{50,3D}}{IC_{50,2D}} \quad (3)$$

Ze získaných výsledků vyplývá, že v případě ponechání 2D buněčných monovrstev glioblastomu U87MG s aplikovanými studovanými sloučeninami za podmínek bez ozáření světelným zdrojem byly pozorovány zásadní rozdíly mezi antiproliferativními aktivitami jednotlivých komplexů (Tabulka 1). Naměřené hodnoty  $IC_{50}$  za podmínek ponechání vzorků ve tmě byly v řádech jednotek až desítek  $\mu\text{M}$ , a to v rozmezí od 4,3  $\mu\text{M}$  (Ir1) do 34,2  $\mu\text{M}$  (Ir10). Nejvyšší hodnoty  $IC_{50}$  byly stanoveny v případě komplexů Ir3 – Ir6 a Ir10 (v rozmezí 21 - 34,2  $\mu\text{M}$ ), které naznačují velmi nízkou antiproliferační aktivitu komplexů vůči buněčné linii U87MG. Komplex Ir1 vykazoval nejvyšší účinnost ze zkoumaných látek a byl 23krát účinnější než klinicky využívaný temozolomid. V případě temozolomidu, který představuje běžně klinicky používané alkylační činidlo při léčbě mozkových nádorů [140], [141], byly stanoveny hodnoty  $IC_{50}$  vyšší než 100  $\mu\text{M}$  (typická hodnota pro U87MG glioblastom) [138]. Všechny studované látky tedy vykazovaly výrazně lepší aktivitu v porovnání s klinicky využívaným chemoterapeutikem.

Po ozáření modrým světlem došlo k výraznému zvýšení aktivity všech komplexů a naměřené hodnoty  $IC_{50}$  poklesly na nízké  $\mu\text{M}$  až submikromolární koncentrace v rozmezí od 0,42  $\mu\text{M}$  (Ir5) do 2,2  $\mu\text{M}$  (Ir10). Tyto výsledky poukazují na skutečnost, že všechny studované sloučeniny jsou fotocitlivé a po jejich aktivaci dochází k zvýšení senzitivace buněk U87MG na aplikovanou léčbu po ozáření modrým světlem. Z těchto parametrů bylo možné dopočítat index fototoxicity (FI), který kvantifikuje míru aktivace studované látky použitým zářením. Stanovené PI testovaných komplexů pro 2D buněčné monovrstvy U87MG se pohybovaly v rozmezí od 3,5 (Ir1) do 60 (Ir5). V tomto případě se jeví jako nejméně aktivovatelný po ozáření modrým světlem komplex Ir1, u něhož byl stanoven FI na 3,5. Naproti tomu komplexy Ir3 – Ir5 vykazovaly nejvyšší FI, což svědčí o mimořádném potenciálu těchto látek pro aplikaci ve fototerapii nádorů.

Tabulka 1: Antiproliferativní aktivita zkoumaných sloučenin stanovená ve 2D a 3D modelech vytvořených z U87MG buněk.

	2D			3D			TMI [-]
	$IC_{50, TMA}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$IC_{50, 420 \text{ nm}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	FI [-]	$IC_{50, TMA}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$IC_{50, 420 \text{ nm}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	FI [-]	
Ir1	4,3 ± 0,1	1,30 ± 0,10	3,5	16,4 ± 0,2	5,7 ± 0,7	2,9	4,4
Ir2	6,9 ± 0,4	0,43 ± 0,02	16,0	14,9 ± 0,5	5,0 ± 0,2	3,0	11,6
Ir3	30,4 ± 4,3	0,67 ± 0,08	45,0	36,6 ± 4,5	6,0 ± 1,0	6,1	9,0
Ir4	21,3 ± 1,4	0,52 ± 0,08	41,0	27,6 ± 4,0	2,1 ± 0,2	13,1	4,0
Ir5	25,3 ± 2,1	0,42 ± 0,03	60,0	32,3 ± 3,3	7,1 ± 0,8	4,5	16,9
Ir6	23,9 ± 3,1	1,00 ± 0,10	23,0	26,0 ± 5,1	8,3 ± 1,1	3,1	8,3
Ir7	7,1 ± 0,4	1,50 ± 0,20	4,7	10,8 ± 1,6	6,7 ± 0,6	1,6	4,5
Ir8	9,3 ± 0,9	0,80 ± 0,05	12,0	19,3 ± 0,7	7,0 ± 0,9	2,8	8,8
Ir9	6,2 ± 0,7	1,30 ± 0,20	4,6	18,9 ± 0,2	7,3 ± 0,3	2,6	5,6
Ir10	34,2 ± 5,3	2,20 ± 0,90	15,5	41,3 ± 1,6	10,5 ± 0,6	3,9	4,8
Temozolomid	≥100	-	-	≥100	95,3 ± 6,4	≥1,2	-

Přestože získaná data pro 2D kultury U87MG buněk ukazují slibný potenciál některých komplexů, stále se jednalo o testy provedené na buněčných systémech, které zcela nereprezentují podmínky *in vivo*. V těle pacienta nebo v prostředí modelového organismu rostou nádory ve formě pevné koule o různém rozměru, homogenitě a různorodém mikroprostředí, které mají zásadní vliv na účinnost aplikované léčby. Z tohoto důvodu byl připraven spolehlivější laboratorní model založený na 3D buněčných kulturách, které měly standardizovanou morfologii a velikost nádoru. Získaná data stanovená pro 3D sféroidy poukazují na významné snížení antiproliferativní aktivity v případě všech komplexů jak za podmínek ponechání ve tmě, tak po aktivaci modrým světlem. I v případě tohoto systému došlo po fotoaktivaci komplexů k výraznému zvýšení cytotoxicity testovaných sloučenin a poklesu naměřených hodnot  $IC_{50}$  na jednotky mikromolů, které se pohybovaly od 2,1 (Ir4) do 10,5 (Ir10)  $\mu$ M. Zároveň došlo také k dramatickému snížení indexu fototoxicity, který se pohyboval v rozmezí od 1,6 (Ir7) do 13,1 (Ir4). Tato skutečnost je pravděpodobně spojena s omezenou schopností zkoumaných komplexů iridia penetrovat do sféroidu. Pozorování ukazuje na zásadní omezení a nedostatky spojené s využíváním pouze 2D buněčných *in vitro* modelů pro hodnocení účinnosti potencionálních cytostatik.

Na závěr byla stanovena celková antiproliferační aktivita testovaných komplexů pro 2D i 3D modely pomocí TMI (indexy nádorové hmoty) stanoveného z poměru naměřených hodnot  $IC_{50}$  pro 3D a 2D modely buněčných kultur po ozáření světelným zdrojem. Nejnížší TMI byl stanoven pro Ir4 (4,0), zatímco nejvyšší TMI byl determinován pro Ir5 (16,9). Tato hodnota ukazuje nejmenší rozdíl mezi antiproliferativní aktivitou 3D a 2D modelu. Data vypočítaná pro klíčové parametry (FI a TMI) ukazují jako nejatraktivnější pro další studium komplexu Ir4.

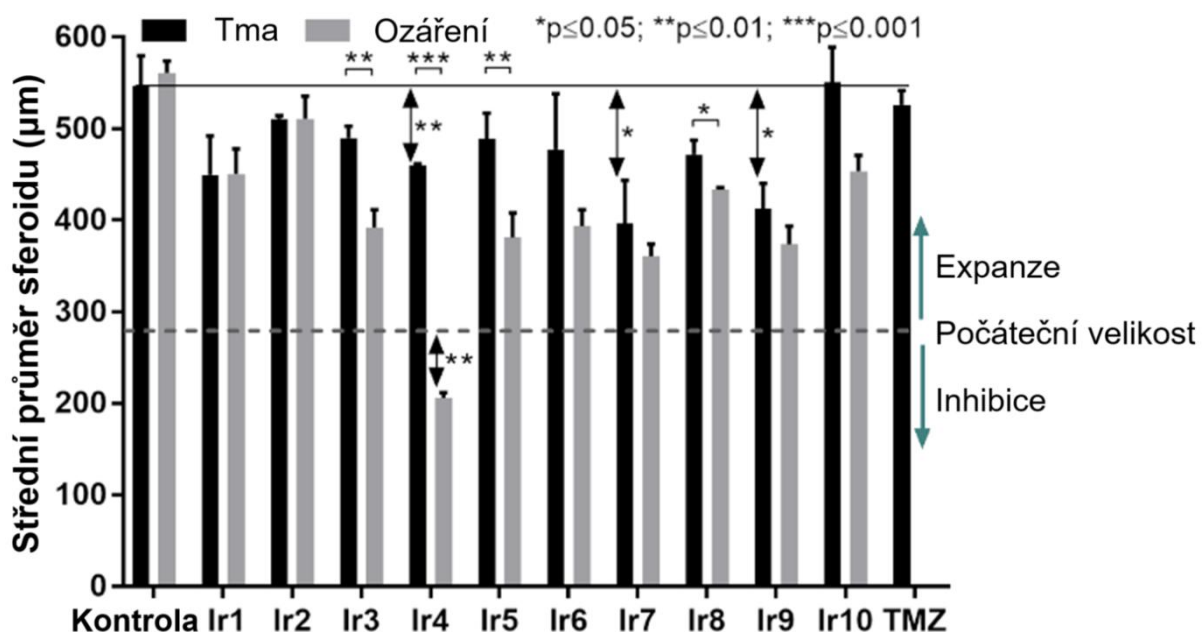
## **5.2 Analýza morfologických parametrů sféroidů po aplikaci testovaných sloučenin v kombinaci s fotodynamickou terapií**

Dále jsme se snažili získat více informací o vlivu aplikované léčby v kombinaci s nebo bez ozáření na nádorové sféroidy. Nádorové buňky vystavené účinku chemoterapeutických činidel vykazují širokou škálu odpovědí (např: při aplikaci  $IC_{50}$  polovina buněk přežívá a polovina umírá), které vedou k zásadním změnám v morfologii sferoidu. Individuální reakce buněk na protinádorové působení látek determinují distribuci různých buněčných stavů v nádorovém sferoidu a společně určují celkovou odpověď tumorového ložiska na terapii [142].

Za tímto účelem byla analyzována morfologie a průměry vytvořených sféroidů odvozených z buněk U87MG. Morfologické parametry 3D modelů byly hodnoceny pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem a monitorovány každých 24 hodin během formování sferoidu (72 hodin před ošetřením) i po aplikaci studovaných komplexů bez nebo v kombinaci s ozářením (72 hodin po ošetření) až do konce experimentu (144 hodin celkem).

Ze získaných výsledků vyplývá, že buněčná linie U87MG patří mezi rychle proliferující kultury vytvářející velké sféroidy za krátký čas při využití 3D formování v prostředí s ULA-povrchem. Rychlost proliferace nádorových buněk patří mezi základní parametry při hodnocení účinnosti terapie. Obecně platí, že rychle rostoucí nádorové buňky jsou obvykle citlivější na aplikovanou léčbu pomocí komplexů na bázi kovů než buňky v klidovém stádiu [143], [144].

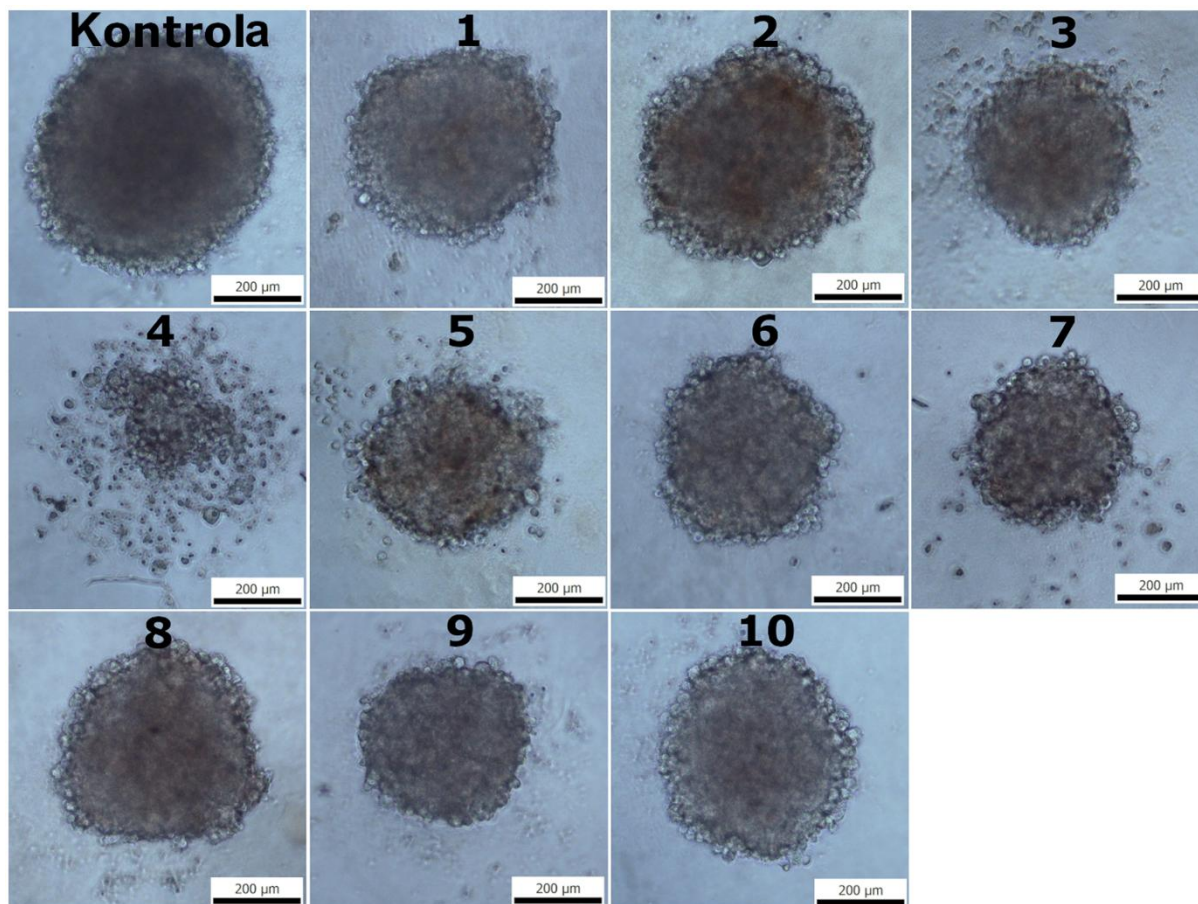
Vytvořené sféroidy měly po ukončení fáze formování střední průměr  $280 \pm 11 \mu\text{m}$ . Průměr neošetřené kontroly na konci experimentu (po 72 hodinách inkubace bez léčiva) byl  $550 \mu\text{m}$  (Obrázek 25). Následně byly analyzovány průměry sféroidů ošetřených ekvitoxickými koncentracemi zkoumaných sloučenin vystavených modrému světlu, které byly porovnány se sféroidy ponechými ve tmě. Hodnoty neozářených vzorků sloužily pro určení vedlejší nespecifické toxicity terapie. Získané velikosti sféroidů představují průměry ze tří nezávislých experimentů ve dvou opakováních pro každý soubor vzorků. Statistická analýza byla provedena pomocí neparametrického studentova t-testu porovnáním naměřených hodnot pro kontrolu s vzorky. Tento statistický test rozdělí získané výsledky podle nulové hypotézy na statisticky významné a nevýznamné. Určí tedy, zda ve vzorku došlo k významnému poklesu nebo nárůstu v porovnání s kontrolou v sledovaném parametru. Nulová hypotéza byla definována jako  $p \leq 0,05^*$ ,  $0,01^{**}$ ,  $0,001^{***}$ , tedy vzorek s koeficientem pravděpodobnosti  $p$  vypočítaným ze statistického studentova T-testu menším než tyto hodnoty (0,05, 0,01 a 0,001) je statisticky významný výsledek a je označen příslušnou značkou (\*). Kromě vzájemného rozdílu naměřených hodnot se také bere v úvahu u statistických testů i počet opakování experimentu.



Obrázek 25: Analýza středních průměrů sféroidů glioblastomu U87MG ošetřených iridiovými komplexy Ir1 – Ir10 a temozolomidem (TMZ).

Generované sféroidy vykazovaly typický pravidelný kulatý tvar bez jasně viditelné bazální laminy. Sféroidy měly světlejší vnější vrstvu s počáteční tvorbou mírně opticky hustého jádra, která naznačuje formaci nekrotického jádra. Po ošetření testovanými sloučeninami v kombinaci s ozářením vykazovaly všechny sféroidy významné morfologické změny, které se projeví zejména zastavením proliferace buněk, menším průměrem a zevně uvolněnými mrtvými buňkami a buněčnými zbytky (Obrázek 26). Sféroidy vytvořené z buněk U87MG mají tendenci při úspěšné léčbě ztrácet svou hustotu vlivem uvolňování vnějších buněk, což vede k jejich disagregaci. Disagregace byla v našem případě zahájena na luminální hranici tedy ve vnější části 3D modelu, nikoli ze sféroidního jádra. Nejvýznamnější morfologické změny

byly pozorovány u vzorků ošetřených komplexem Ir4. V případě této sloučeniny došlo k snížení středního průměru sféroidu až pod počáteční velikost sféroidů před ošetřením testovanými sloučeninami. Tyto výsledky naznačují nejen významný cytostatický účinek aplikované léčby, ale také systémovou toxicitu bránící dalšímu růstu sféroidů po terapii.



Obrázek 26: Analýza morfologie sféroidů glioblastomu U87MG ošetřených iridiovými komplexy Ir1 – Ir10 a temozolomidem (TMZ).

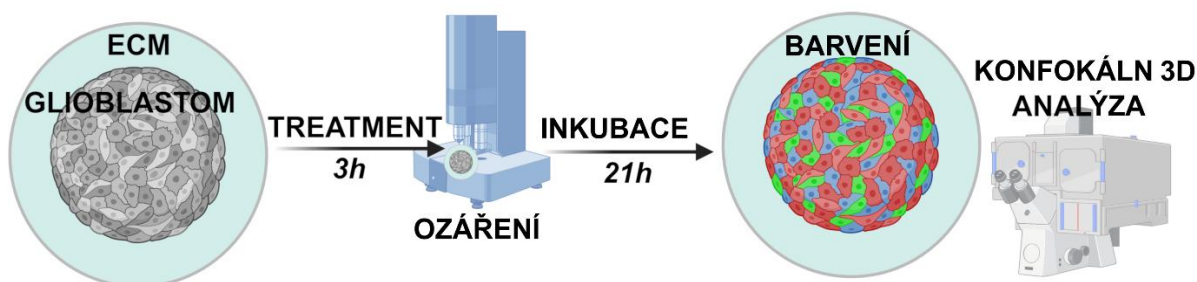
Získaná data popisující působení ostatních zkoumaných komplexů iridia na morfologii sféroidů ukazují pouze mírný vliv na jejich růst, i když významnější, než byl účinek klinicky používaného temozolomidu v léčbě mozkových nádorů. Ovšem tento závěr není překvapivý vzhledem ke známé rezistenci mozkových nádorů vůči chemoterapii [143], [144].

Pro zefektivnění následných experimentálních studií zabývajících se odhalením mechanismu působení zkoumaných iridiových komplexů souvisejícího s fototerapeutickou intervencí mozkových nádorů, byly vybrány kandidátní sloučeniny na základě hodnocení antiproliferativní aktivity testovaných látek. Mezi tyto látky patří nejen komplex Ir4, ale také sloučeniny Ir3 a Ir5, které v některých případech vykazovaly podobnou aktivitu jako komplex Ir4.

### 5.3 Stanovení metabolické aktivity sferoidů ošetřených zkoumanými komplexy v kombinaci s fotodynamickou terapií

Ze získaných výsledků analýzy vlivu iridiových komplexů v kombinaci s ozářením na morfologii nádorových sferoidů byla stanovena celková odpověď nádorového sferoidu na aplikovanou léčbu, která vede v případě všech komplexů k zastavením proliferace buněk a k zevní disagregaci mrtvých buněk a buněčných zbytků. Ovšem tato data nám neposkytují dostatečné informace o účinku testovaných komplexů na metabolickou aktivitu buněk sferoidu. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli podrobněji zabývat vlivem aplikované léčby pomocí vybraných zástupců iridiových sloučenin v kombinaci s ozářením modrým světlem. Buněčná odpověď sferoidů glioblastomu U87MG (zapaštěných do Matrigelu) na látky Ir3, Ir4 a Ir5 za podmínek cíleného ozařování pomocí konfokálního mikroskopu byla zkoumána pomocí následného barvení různými fluorescenčními sodami. Kalcein AM byl využit k analýze metabolicky aktivních (živých) buněk, zatímco fluorochrom propidium jodid (PI), který selektivně proniká do buněk s narušenou permeabilitou cytoplazmatické membrány, sloužil k detekci mrtvých buněk [145]. Barvivo Hoechst 33258 bylo použito k přesné definici obrysů sferoidu, což umožnilo použít vytyčenou oblast sferoidu (ROI) pro analýzu intenzity fluorescence a kvantifikaci poměrů Kalcein AM/PI. Tento metodický přístup umožňuje zaznamenávat vitalitu buněk v mnohobuněčných sferoidech, včetně příjmu a difúze léčiva v 3D sferoidních modelech i za podmínek řízeného ozařování [146].

Předem vytvořené sferoidy (72hodinová agregace v ULA destičkách s 24hodinovou kultivací v Matrigelu) byly ošetřeny komplexy Ir3, Ir4 nebo Ir5 v koncentracích odpovídajících  $IC_{50}$  stanovených pro ozářené vzorky po dobu 3 hodin. Jedna sada vzorků byla následně selektivně ozářena pomocí konfokálního mikroskopu modrým světlem o vlnové délce 405 nm (1 mW) po dobu 60 s, zatímco druhá sada byla ponechána ve tmě. Poté byly sferoidy přemístěny do média bez léčiva. Po 24hodinové inkubaci za „drug free“ stavu byly sferoidy barveny kalceinem AM, PI a Hoechst 33258. Výsledné snímky byly pořízeny konfokálním mikroskopem pomocí 3D projekce (Obrázek 27).

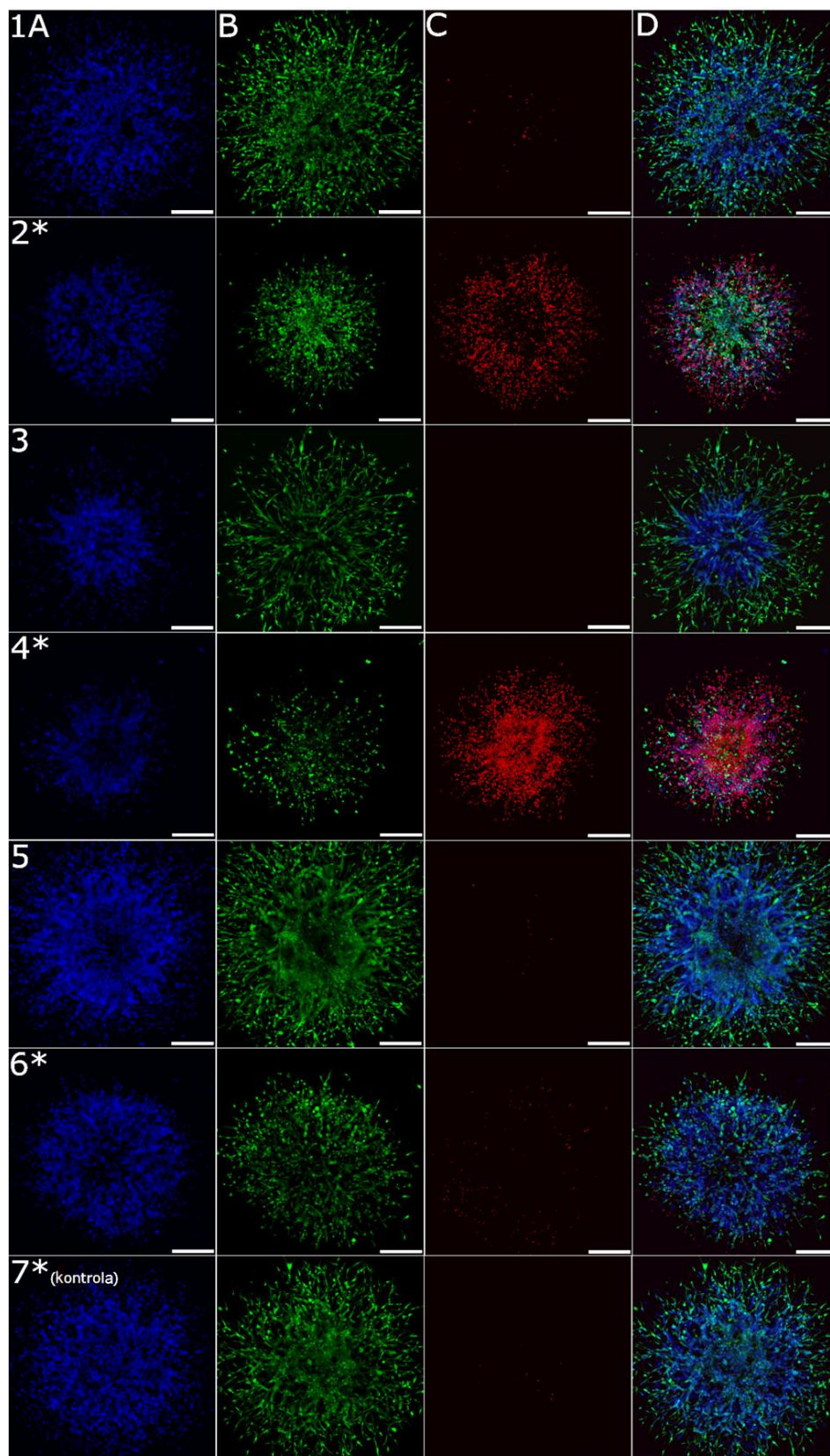


Obrázek 27: Schéma postupu stanovení metabolické aktivity ošetřených buněk sferoidů.

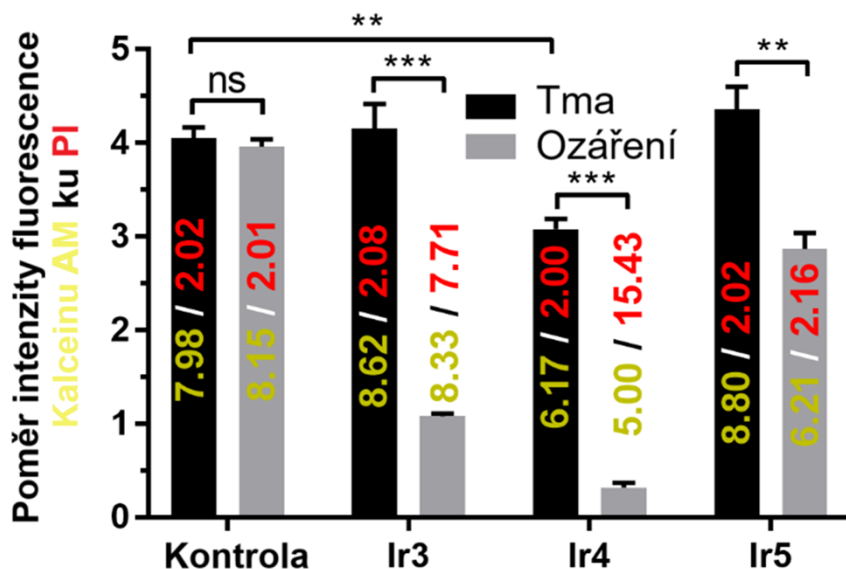
Na snímcích z konfokálního mikroskopu lze porovnat výsledky jednotlivých barvení sferoidů barvivy Hoechst 33258 (panel A), kalceinem AM (panel B) a propidium jodidem (panel C) i všechny sloučené kanály (panel D). Ze získaných snímků z konfokálního mikroskopu jsou patrné významné rozdíly v množství živých a mrtvých buněk mezi ozářenými a ve tmě inkubovanými vzorky pro komplexy Ir3 a Ir4. V případě neozářených preparátů ošetřených látkami Ir3 (Obrázek 28, panely 1) a Ir4 (Obrázek 28, panely 3) nedošlo

k pozorování výrazných morfologických změn ani odhalení zásadních rozdílů v metabolické aktivitě buněk sferoidů v porovnání s kontrolou. Po ozáření modrým světlem došlo v případě sferoidů ošetřených Ir3 (Obrázek 28, panely 2\*) i Ir4 (Obrázek 28, panely 4\*) k zásadnímu narušení morfologie 3D systému, reprezentované především zmenšeným průměrem sferoidů a sníženým množstvím detekovaných metabolicky aktivních buněk primárně lokalizovaných v hustém sféroidním jádru (Obrázek 28, panely B 2\* a 4\*). V případě 3D modelu ošetřeného sloučeninou Ir3 v kombinaci s ozářením došlo k výraznému nárůstu počtu mrtvých buněk zejména v oblasti vnějšího lemu sferoidu, zatímco po aplikaci komplexu Ir4 v kombinaci s ozářením byly mrtvé buňky detekovány především v jádře sferoidu (Obrázek 28, panely C 2\* a 4\*). V případě ozářených vzorků ošetřených sloučeninou Ir5 (Obrázek 28, panely 6\*) došlo překvapivě k vyvolání srovnatelného účinku se vzorky ošetřenými Ir4 inkubovanými ve tmě, a tedy byla ovlivněna metabolická aktivita buněk a snížený průměr sferoidu. Tyto vzorky vykazovaly pouze mírné snížení fluorescence kalceinu AM a mírné zvýšení počtu mrtvých buněk, jak je indikováno barvením PI (Obrázek 28, panely C 6\*). Nízká aktivita komplexu Ir5, je pravděpodobně přímým důsledkem snížené akumulace této látky ve sféroidech glioblastomu U87MG.

Pro lepší porovnání vyvolaných změn v metabolické aktivitě ošetřených nádorových buněk byla kvantifikována intenzita fluorescence Kalceinu AM a PI ve vymezené oblasti zájmu, určené barvením Hoechst 33258, pomocí analýzy obrazu mikrofotografií pořízených konfokální mikroskopií. Ze získaných dat tří nezávislých experimentů byly stanoveny pro každý vzorek hodnoty průměrných intenzit fluorescence použitých fluorochromů pro výpočet poměru kalceinu AM/PI (Obrázek 29). Následně byla provedena statistická analýza pomocí neparametrického studentova t-testu porovnáním vypočítaných poměrů intenzit fluorescence pro kontrolu s experimentálními vzorky. Tento statistický test rozdělil získané výsledky podle nulové hypotézy na statisticky významné a nevýznamné, podle významnosti poklesu nebo nárůstu hodnoty stanovené pro vzorek v porovnání s kontrolou v sledovaném parametru. V našem případě byla nulová hypotéza definována jako  $***p \leq 0,001$ , tedy vzorek s koeficientem pravděpodobnosti  $p$  vypočítaným ze statistického studentova t-testu menším než 0,001 je statisticky významný výsledek a je označen značkou (\*\*\*). V případě nulové hypotéza definována jako  $**p \leq 0,01$  se jedná o statisticky méně významný výsledek (\*\*). Pokud byl vypočítaný koeficient vyšší byly tyto rozdíly určeny jako statisticky nevýznamné (ns).



Obrázek 28: Analýza sferoidů ošetřených komplexy Ir3 (panely 1, 2\*), Ir4 (panely 3, 4\*) a Ir5 (panely 5, 6\*) obarvených barvivem Hoechst 33258 (A), kalceinem AM (B), propidium jodidem (C) a přeložení všech kanálů (D) pomocí konfokálního mikroskopu. Měřítka představuje 200  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 29: Kvantifikace poměru intenzity fluorescence Kalceinu AM k PI stanovené pro jednotlivé experimentální skupiny.

Stanovené hodnoty intenzit fluorescence ukazují nevýznamné změny v poměrech kalceinu AM/PI za inkubace vzorků ve tmě po ošetření komplexu Ir3 a Ir5. Sféroidy U87MG ošetřené Ir4 (inkubované ve tmě) však vykázaly významný pokles poměru kalcein AM/PI způsobený snížením fluorescenčního signálu poskytovaného kalceinem AM (Obrázek 29). Došlo tedy k poklesu metabolické aktivity buněk sféroidů. Po ozáření došlo v případě všech testovaných sloučenin (Ir3, Ir4 a Ir5) k snížení poměru kalceinu AM/PI, způsobeného především zvýšením detekovaného signálu propidium jodidu. V případě ozářených vzorků ošetřených sloučeninou Ir5 došlo pouze k mírnému snížení fluorescence kalceinu AM a mírnému zvýšení fluorescence PI.

Nejvýraznější účinky na sféroidy glioblastomu U87MG byly pozorovány po ošetření komplexu Ir3 a Ir4 v kombinaci s ozářením modrým světlem (Obrázek 28). Poměr AM/PI kalceinu značně poklesl v důsledku snížení počtu metabolicky aktivních buněk ve sféroidu glioblastomu za současného enormního zvýšení množství mrtvých buněk. Tento účinek byl zvláště patrný po aplikaci Ir4 na sféroidy glioblastomu U87MG v kombinaci s ozářením, což potvrzuje vynikající fotoaktivaci Ir4 při působení vůči buňkám glioblastomu.

Pozorované účinky komplexu Ir4 na metabolickou aktivitu a morfologii 3D modelů, stejně jako jeho selektivní působení po aktivaci modrým světlem, představují cenné informace o potenciální účinnosti této látky při cílené léčbě sféroidů glioblastomu U87MG. Tyto závěry ukazují na důležitost dalšího zkoumání mechanismů působení a potenciálního využití zkoumaných sloučenin iridia v cílených terapeutických přístupech cílících na glioblastom.

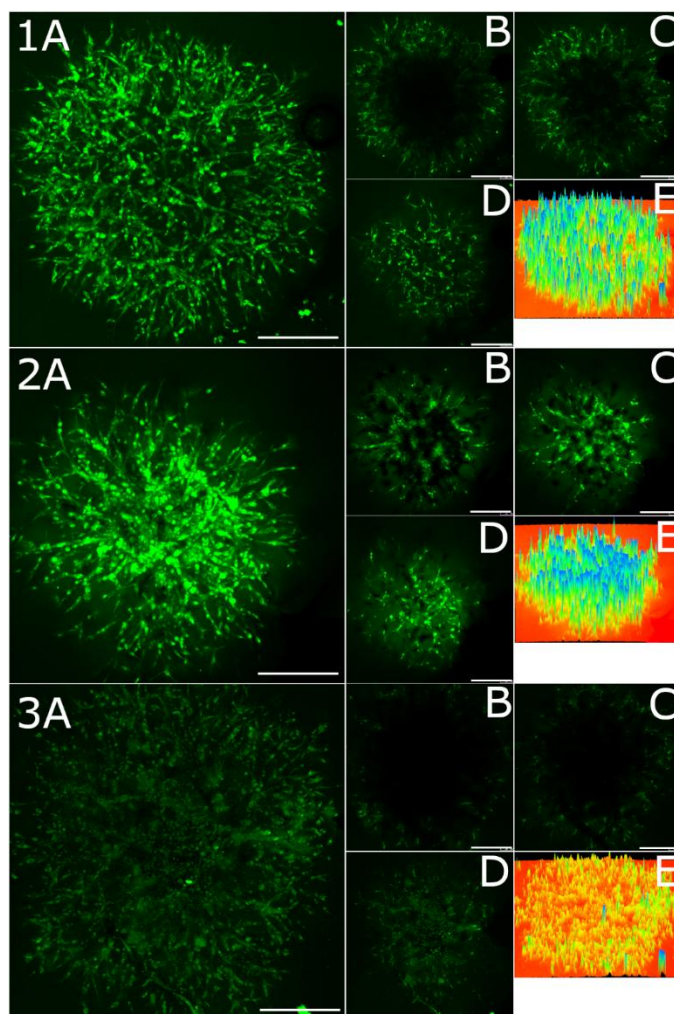
## 5.4 Distribuce zkoumaných komplexů iridia ve sféroidech glioblastomu U87MG

Mnohobuněčné 3D systémy představují fyziologicky relevantnější modely napodobující mikroprostředí nádorů *in vivo*, které umožňují podrobnější studium penetrace a distribuce léčiv v rámci malignit a pochopení reakce nádorových buněk na aplikovanou léčbu [117]. Citlivost a odpověď buněk mikrotumoru na cytostatika je v *in vivo* podmínkách zásadně ovlivněna interakcemi buňka–buňka a buňka–extracelulární matrice (ECM), které mohou vést k zásadním změnám (struktury, tuhosti, složení) ECM [119]. Při tumorigenezi velmi často dochází vlivem změny složení a zastoupení komponent (kolagenu, fibronektinu, elastinu, kyseliny hyaluronové atd.) ECM k tunutí matrice. Remodelace ECM pak zásadně ovlivňuje řadu kritických biologických procesů klíčových během rozvoje rakoviny, jako jsou proliferace, angiogeneze, rezistence nádoru vůči terapeutikům a nestabilita jeho genomu [50], [119]. Interakce glioblastomu s ECM tedy podporuje invazivitu nádorových sferoidů.

Z výše uvedených důvodů byla analyzována distribuce testovaných sloučenin ve složitějších modelech sferoidů odvozených z buněk U87MG vložených do matrice Matrigel. Připravené sferoidy byly ošetřeny testovanými komplexy (Ir3, Ir4 a Ir5) po dobu 3 hodin. Fluorescence poskytovaná studovanými sloučeninami byla analyzována pomocí konfokálního mikroskopu v definovaných z-rovinách, pro které byly vyneseny profily maximální intenzity fluorescence. Konečný průměr ošetřených sféroidů byl přibližně 1 mm.

Z pořízených snímků je patrné, že změny ve složení modelu způsobily významné rozdíly v morfologii sferoidu ve srovnání s nezapuštěnými 3D systémy kultivovanými za ULA podmínek. Zapuštěné sferoidy v matrigelu působí velmi difuzně a vykazují vysokou invazivitu. Po ošetření těchto vzorků studovanými komplexy nebyly pozorovány zásadní morfologické změny jako je disagregace buněk či zmenšení průměru mikrotumoru, stanovené pro 3D modely kultivované bez matrigelu. Tyto výsledky potvrzují, že přítomnost ECM ovlivňuje morfologii malignity stejně jako její buněčnou odpověď na podané léčivo.

Ze snímků pořízených konfokálním mikroskopem vyplývá, že většina analyzovaného fluorescenčního signálu byla umístěna v intracelulárním prostoru vytvořeného sféroidu. Po ošetření tumoru tedy došlo primárně k akumulaci studovaných komplexů v buňkách nádoru. V případě ošetření sferoidů sloučeninou Ir4 bylo však možné pozorovat i slabou extracelulární fluorescenci, která byla pravděpodobně způsobena reakcí komplexu s Matrigelem (Obrázek 30, panel 2D). Detailní kvalitativní analýza penetrace komplexů do hmoty sféroidů U87MG ukázala na významné rozdíly v působení a schopnosti transportu do buněk mezi jednotlivými testovanými sloučeninami. U vzorků ošetřených komplexy Ir3 a Ir5 byla většina fluorescenčního signálu lokalizovaná v 300  $\mu\text{m}$  vnějším obalu sferoidu. V případě středních průřezů vzorků sferoidů ošetřených těmito látkami můžeme vidět ostré rozhraní mezi jádrem sferoidu a vnějším obalem mikrotumoru. Tyto výsledky potvrdily závěry dřívějších experimentů, že komplexy Ir3 a Ir5 mají velmi omezenou penetraci do 3D systému, která výrazně snižuje celkový terapeutický účinek těchto sloučenin (Obrázek 30, 1E a 3E). Naproti tomu sféroidy ošetřené látkou Ir4 vykazovaly konzistentní distribuci sloučeniny ve hmotě sféroidů pouze s výskytem občasných malých nepravidelných oblastí bez fluorescence ve střední části sféroidů U87MG.



Obrázek 30: Distribuce zkoumaných komplexů Ir3 (panel 1), Ir4 (panel 2) a Ir5 (panel 3) ve sféroidech glioblastomu U87MG analyzována konfokální mikroskopií, kdy pane A odpovídá celkové projekci fluorescence aplikovaných látek, panely B, C a D představují pouze vybrané vrstvy sferoidu (střední, mírně vyšší a horní část) a panel E ukazuje 3D povrchový graf projekce maximální intenzity fluorescence. Měřítko představuje 300  $\mu\text{m}$ .

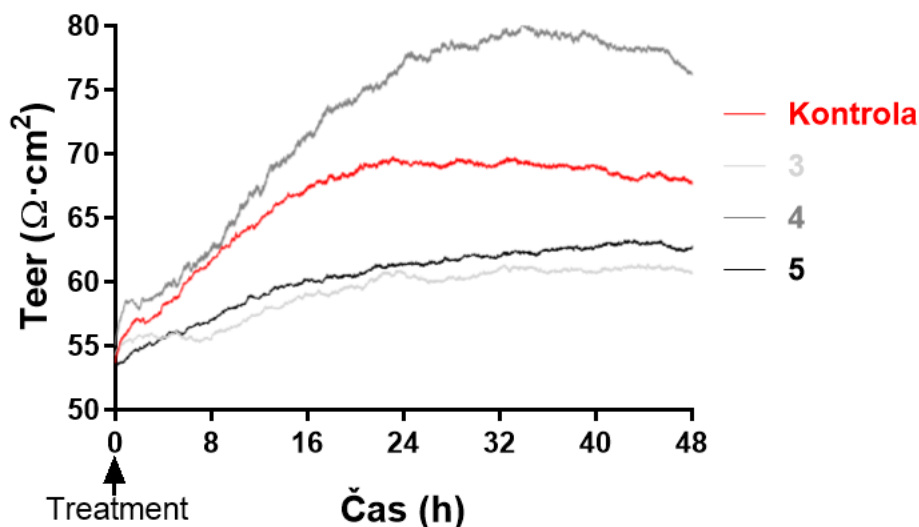
Je důležité poznamenat, že schopnost protinádorových sloučenin pronikat do sféroidů úzce souvisí s jejich protinádorovou aktivitou. Účinnost protirakovinných sloučenin je tedy ovlivněna řadou faktorů, jako jsou vlastnosti léčiva, velikost sféroidů a přítomnost ECM. Zařazení studie distribuce protirakovinných sloučenin ve sféroidech uložených v extracelulární matrici představuje zásadní krok pro pochopení nádorové biologie a vývoji účinné léčby rakoviny.

Tato studie tedy potvrdila, že vybrané iridiové sloučeniny vykazují odlišné penetrační chování nejen do volných 3D systémů, ale i do sféroidu umístěného v extracelulární matrigelové matrici. Přičemž ze všech studovaných komplexů vykazoval Ir4 nejvyšší tkáňovou penetraci. Tyto závěry spolu se slibnými fotoaktivovatelnými vlastnostmi podtrhují účinnost Ir4 pozorovanou v testech antiproliferativní aktivity (Tabulka 1).

## 5.5 Monitorování transportu testovaných sloučenin přes hematoencefalickou bariéru

Při terapii jakéhokoliv onemocnění mozku představuje zásadní roli schopnost aplikovaného léčiva procházet přes hematoencefalickou bariéru (BBB; blood-brain barrier), která brání a omezuje dodávání léčiva do centrálního nervového systému. V současné době existuje široká škála *in vitro* 3D BBB modelů, které umožňují studovat permeabilitu BBB membrány a kvantifikovat množství transportované látky [147], [148]. V naší práci byly pro stanovení schopnosti prostupu studovaných komplexů využity statické modely BBB na bázi hydrogelu (kolagen I) s imortalizovanou kulturou lidských cerebrovaskulárních hCMEC/D3 buněk, které představují standardizovaný systém využívaný jako *in vitro* BBB model [113], [149], [150], [151]. Integrita vytvořených BBB modelů bývá nejčastěji hodnocena pomocí TEER systému, který je založen na měření transendoteliálního elektrického odporu v reálném čase, čímž umožňuje monitorování a hodnocení integrity a propustnosti buněčné bariéry po podání léčiva [152]. Tento model byl vytvořen naočkováním  $5 \cdot 10^4$  buněk na jeden 24-jamkový insert potažený kolagenem I. Buňky hCMEC/D3 byly kultivovány po dobu 7 dní, při kterých došlo k jejich úplné diferenciaci a vytvoření modelu bariéry. Pre-kultivované inserty s vrstvou BBB modelů byly ošetřeny ve tmě testovanými sloučeninami o konečné koncentraci 10  $\mu$ M. Integrita systému byla monitorována nepřetržitě po dobu 48 hodin od aplikace komplexů.

Ze získaných dat je patrné, že veškeré připravené inserty pro studii permeability léčiv vykazovaly po ošetření hodnoty TEER v rozmezí 53–80  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  [113], [149], [151]. Tyto výsledky korelují s hodnotami TEER nad 50  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  získanými pro plně vyvinuté *in vitro* BBB modely odvozené z buněk hCMEC/D3 jinými autory [113], [149], [151]. Po aplikaci léčiv bylo pozorováno kontinuální časově závislé zvýšení hodnot měřeného odporu (Obrázek 31). Tento nárůst byl pravděpodobně způsoben neustálým formováním membrány. Mohlo dojít k růstu nebo dělení buněk či k jejich přeorganizování. Po uplynutí 24 hodin od ošetření buněk bylo v případě všech komplexů pozorováno zpomalení nebo zastavení růstu odporu a ustálení měřené hodnoty, které souvisí s ukončením formování membrány. Tato skutečnost dále naznačuje, že aplikované sloučeniny nenarušují permeabilitu BBB bariéry a nedochází k její perforaci. Je zajímavé, že v případě komplexu Ir4 došlo k výraznému zvýšení naměřeného odporu v porovnání s kontrolou. Nárůst mohl být způsoben specifickou odpovědí buněk vyvolanou stresovým faktorem.



Obrázek 31: Monitorování integrity a propustnosti buněčné bariéry po aplikaci studovaných komplexů v reálném čase.

Po optimalizaci a charakterizaci *in vitro* BBB modelu jsme se zaměřili na stanovení permeačních koeficientů ( $P_{app}$ ) pro kvantifikování a určení rozdílu mezi jednotlivými zkoumanými sloučeninami při penetraci BBB membrán generovaných z buněk hCMEC/D3. Tato analýza byla prováděna současně s měřením integrity modelu pomocí systému TEER, kdy bylo během experimentu v předem určených časových intervalech (30, 60, 105 a 150 minut od treatmentu) odebráno z apikální (80  $\mu$ l) i bazolaterální (200  $\mu$ l) části sestrojeného modelu malé množství média. Koncentrace testovaných sloučenin iridia v odebraných vzorcích byly analyzovány pomocí ICP-MS a ze získaných hodnot byly následně vypočítány  $P_{app}$  koeficienty zkoumaných komplexů za využití vzorce

$$P_{app} = \left( \frac{dC}{dt} \right) \cdot \left( \frac{V_r}{A \cdot C_0} \right),$$

kde  $dC/dt$  je kumulativní koncentrace odpovídající komplexu iridia v průběhu času měřená v bazolaterálním kompartmentu (koncentrace/čas),  $V_r$  je objem bazolaterálního kompartmentu systému (1,5 ml),  $A$  je povrchová plocha vložky insertu obsahující buňky membrány (0,336  $\text{cm}^2$ ) a  $C_0$  je počáteční koncentrace sloučeniny v apikální oblasti systému ( $\mu\text{g/ml}$ ) [153]. Získané koeficienty permeability ( $\text{cm/s}$ ) byly následně porovnány s hodnotami získanými pro klinicky používané cytostatikum temozolomid (Tabulka 2) [154].

Tabulka 2: Koeficienty permeability měřené pro model BBB vytvořený z buněk hCMEC/D3.

Sloučeniny	$P_{app} \cdot 10^{-4} (\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$
Ir3	$0,21 \pm 0,05$
Ir4	$3,40 \pm 0,20$
Ir5	$0,19 \pm 0,04$
Temozolomid	0,36

Při srovnání získaných koeficientů permeability jsou patrné významné rozdíly mezi jednotlivými testovanými sloučeninami. Hodnoty Papp stanovené pro komplexy Ir3 a Ir5 byly výrazně nižší, a to o více než jeden řád v porovnání s výsledky vypočítanými pro látku Ir4. Tyto data poukazují na výrazně méně účinnou schopnost komplexu Ir3 a Ir5 pronikat skrz BBB membránu v porovnání s Ir4. Zároveň je velmi zajímavé porovnání koeficientu permeability klinicky používaného cytostatika temozolomidu s hodnotami získanými pro sloučeninu Ir4, která proniká přes BBB model výrazně účinněji. Schopnost procházet přes BBB model ukazuje na veliký potenciál sloučenin na bázi kovů pro jejich další využití.

## 5.6 Kokultivační model BBB s buňkami U87MG a následnou analýzou buněčné akumulace

Účinnost protirakovinných léčiv při terapii cerebrálních nádorů a metastáz závisí nejen na schopnosti sloučenin procházet přes hematoencefalickou bariéru (BBB), ale také na následném buněčném příjmu aplikované látky a její distribuci v nádorové tkáni [112]. Skutečnost, že farmakum úspěšně prochází skrz BBB membránu nemusí vždy korelovat s účinnou akumulací léčiva v cílové tkáni (mozku) [155]. Buněčný příjem podaného komplexu může být ovlivněn mnoha faktory jako je celková farmakokinetika látky, míra vaskularizace nebo složení mikroprostředí nádoru. Efektivita buněčného příjmu cytostatika představuje kritický aspekt při terapeutickém působení na mozkové nádory. Studie buněčného vychytávání tedy umožňují hodnotit rozsah příjmu, distribuci a lokalizaci sloučenin v buňkách mozkového nádoru a posoudit potenciální účinnosti komplexu při cíleném působení na maligní tkáň [112].

Za tímto účelem byl připraven kokultivační BBB model složený z buněk glioblastomu U87MG v bazolaterální části systému a epiteliálních buněk hCMEC/D3 reprezentující hematoencefalickou bariéru v apikální část inzertu. Do apikální části tohoto modelu byl následně aplikován studovaný komplex Ir4 o konečné koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Po 24-hodinové inkubaci byly obě buněčné linie sklizeny, spočítány a pomocí ICP-MS bylo stanoveno množství iridia naakumulovaného oběma buněčnými liniemi.

Tabulka 3: Naakumulované množství iridia stanovené ve využitých buněčných liniích ko-kultivačního BBB modelu.

Ošetřené buněčné kultury	Buněčný Ir uptake (ng Ir/10 <sup>6</sup> cells)
hCMEC/D3 – ko-kultura s U87MG	47,1 ± 6,9
U87MG – ko-kultura s hCMEC/D3	108,4 ± 14,3
U87MG - monokultura	166,0 ± 7,2

Získané výsledky ukazují na převládající trend akumulace testovaného komplexu Ir4 v buňkách glioblastomu U87MG (108 ng Ir/10<sup>6</sup> buněk) nad jeho hromaděním v epiteliálních buňkách hCMEC/D3 (47 ng Ir/10<sup>6</sup> buněk) ko-kultivačního modelu (Tabulka 3). Ovšem přesto bylo poměrně významné množství aplikované dávky vychytáno nenádorovými buňkami BBB modelu. Snížení přijaté terapeutické dávky by pak mohlo ovlivnit celkovou úspěšnost aplikované léčby. Tyto výsledky byly dále porovnány s daty buněčného příjmu stanovenými pro model monokultury buněk glioblastomu U87MG. V případě monokulturního systému bylo stanoveno výrazně vyšší množství naakumulovaného iridia (166 ng Ir/10<sup>6</sup> buněk) ve srovnání

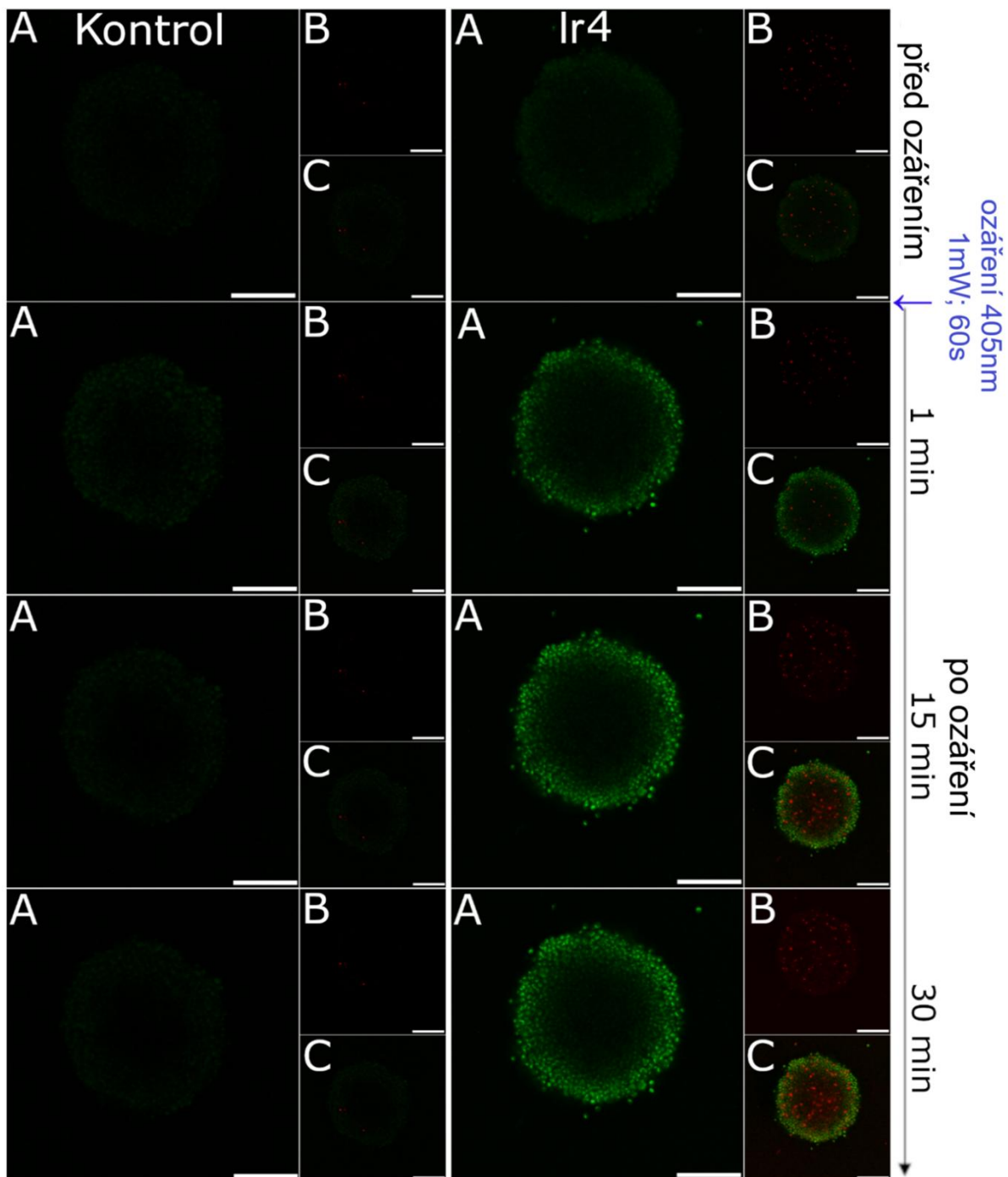
s ko-kultivačním modelem. Průchod sloučeniny Ir4 přes hematoencefalickou membránu tedy snižuje aplikovanou dávku působící na cílový tumor, přesto je však aplikovaná látka majoritně vychytávána nádorovou tkání. Další studium buněčného příjmu těchto sloučenin na bázi iridia pak mohou pomoci při vývoji a optimalizaci nových nosičových systémů transportujících léky do mozkových nádorů a metastáz.

## 5.7 Detekce reaktivních forem kyslíku ve sféroidech U87MG

Po vystavení světlo-citlivých látek světelnému zdroji dochází v případě některých cytostatik k indukci tvorby reaktivních forem kyslíku (ROS) z atomárního kyslíku v cíleně ozářených nádorových buňkách. Vysoká hladina ROS vede většinou k rozvoji oxidačního stresu, při kterém dochází k oxidativnímu poškození buněčných složek (např. proteinů, lipidů a DNA). Destrukce zásadních buněčných komponent může vyvolat apoptózu nebo nekrózu nádorových buněk [156]. Vývoj terapeutických platform kombinující chemoterapeutické působení generovaných ROS a fotodynamickou terapii se světelným zobrazováním nádorových ložisek při laserovém ozařování, je považováno za nezbytný krok pro zlepšení léčby rakoviny [157]. Tato multifunkční terapeutická metoda umožňuje cílené ošetření tumoru s působením minimální systémové toxicity [156].

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli otestovat indukci ROS ve sféroidech glioblastomu U87MG ošetřených komplexem Ir4 v kombinaci s ozářením modrým světlem produkovaným konfokálním mikroskopem. Generované ROS byly kvantifikovány současným barvením sféroidů fluorescenční sondou CellRox® a PI, pro stanovení možné okamžité buněčné smrti. Snímky vzorků byly pořízeny před ozářením a 1, 15 a 30 minut po ozářením modrým světlem v 10 vrstvách. Množství vytvořených ROS bylo kvantifikováno jako průměrná intenzita fluorescence sondy v maximální projekci z-stacků (Obrázek 32).

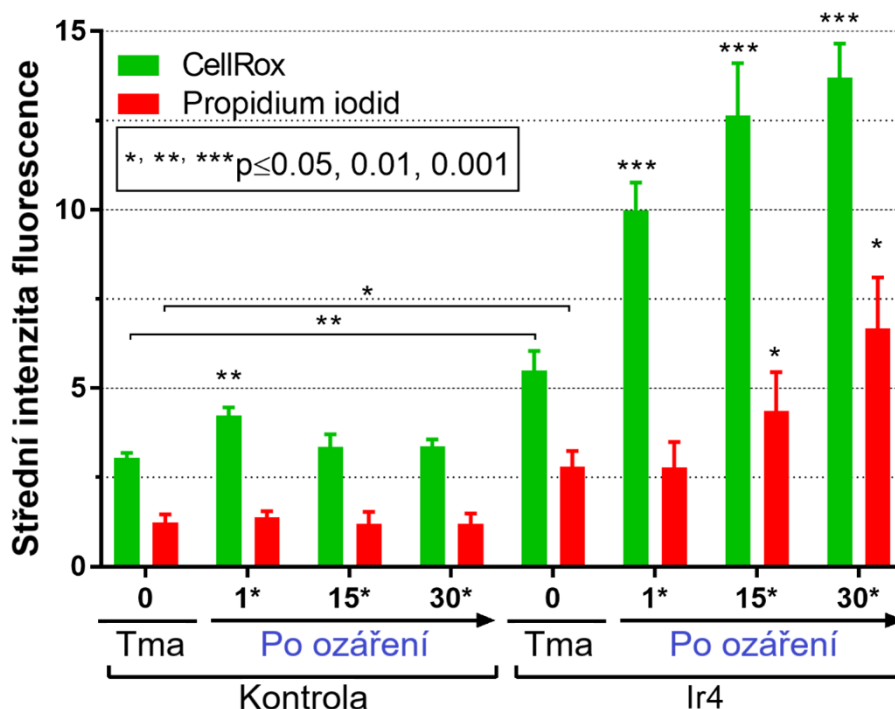
Na snímcích z konfokálního mikroskopu lze porovnat výsledky jednotlivých barvení ošetřených sferoidů i neošetřených kontrol barvivy CellRox® (Obrázek 32, panel A), propidium jodid (Obrázek 32, panel B) i všechny sloučené kanály (Obrázek 32, panel C) v definovaných časových intervalech před i po ozářením vzorků. Již při vizuálním porovnání pořízených snímků jsou patrné významné rozdíly v množství produkovaných ROS i mrtvých buněk mezi ošetřenými a kontrolními vzorky. V případě neozařených preparátů došlo po aplikaci komplexu Ir4 k pozorování výrazného navýšení produkce ROS v porovnání s kontrolou. Po ozářením modrým světlem došlo v případě sferoidů ošetřených Ir4 k zásadnímu zvýšení množství detekovaných ROS a nárůstu počtu mrtvých buněk. U neošetřených kontrol byla jediná významná změna v množství ROS pozorovaná bezprostředně po ozářením (1 min).



Obrázek 32: Detekce ROS ve sféroidech glioblastomu U87MG před a po ozáření vzorků modrým světlem (420 nm, 1mW, 60 s) obarvených sondou CellRox® (panel A), PI (panel B) a překrytí obou kanálů (panel C). Obrázky reprezentují projekci 10 vrstev. Měřítka snímků je 300  $\mu\text{m}$ .

Pro lepší porovnání sledovaných změn byla stejně jako v případě experimentu cíleného na metabolickou aktivitou nádorových buněk kvantifikována intenzita fluorescence sond CellRox® a PI ve vymezené oblasti zájmu pomocí analýzy obrazu mikrofotografií pořízených konfokální mikroskopií (Obrázek 33). Ze získaných dat tří nezávislých experimentů byly stanoveny hodnoty středních intenzit fluorescence použitých fluorochromů vzorku a následně

byla provedena statistická analýza pomocí neparametrického studentova t-testu porovnáním vypočítaných poměrů intenzit fluorescence pro kontrolu s experimentálními vzorky.



Obrázek 33: Kvantifikace průměrné intenzity fluorescence CellRox® a PI ve sféroidech U87MG ozářených modrým laserovým světlem.

V případě sferoidu ošetřeného komplexem Ir4 bez ozáření byla stanovena hodnota intenzity fluorescence CellRox® 1,8krát vyšší než hladina ROS detekována u neošetřené kontroly (Obrázek 33). Tyto výsledky naznačují, že ROS generované za tmy mohou přispívat ke snížené metabolické aktivitě ve sféroidech, jak bylo pozorováno v dřívějším experimentu při barvení kalceinem AM za podmínek bez ozáření (Obrázek 28 a kvantifikace Obrázek 29). Po ozáření vykazovaly vzorky ošetřené sloučeninou Ir4 kontinuální nárůst ROS. Stanovené hladiny ROS v časových intervalech 1, 15 a 30 minut po ozáření u ošetřených vzorků byly 1,8; 2,3 a 2,5-krát vyšší než hladiny pozorované u ošetřených sferoidů před ozářením. Spolu s nárůstem množství ROS, bylo také pozorováno mírné, ale významné zvýšení střední intenzity fluorescence PI v případě ošetřených vzorků v čase 15 a 30 minut po ozáření, který ukazuje na rychlou iniciaci buněčné smrti a přímý důsledek produkce ROS po ošetření Ir4 v kombinaci s ozařováním modrým laserem. U neošetřených kontrol byly před i po ozáření pozorovány pouze zanedbatelné změny v hladině ROS. K významné změně v hladině ROS došlo u neošetřených kontrol pouze bezprostředně po ozáření (1 min), stanovené jako 1,4násobné zvýšení intenzity fluorescence. Tato zjištění podtrhují potenciál Ir4 při indukci rychlé a trvalé cytotoxicity zprostředkované ROS a zdůrazňují potenciál tohoto komplexu jako možného kandidáta pro další výzkumy v kontextu léčby rakoviny.

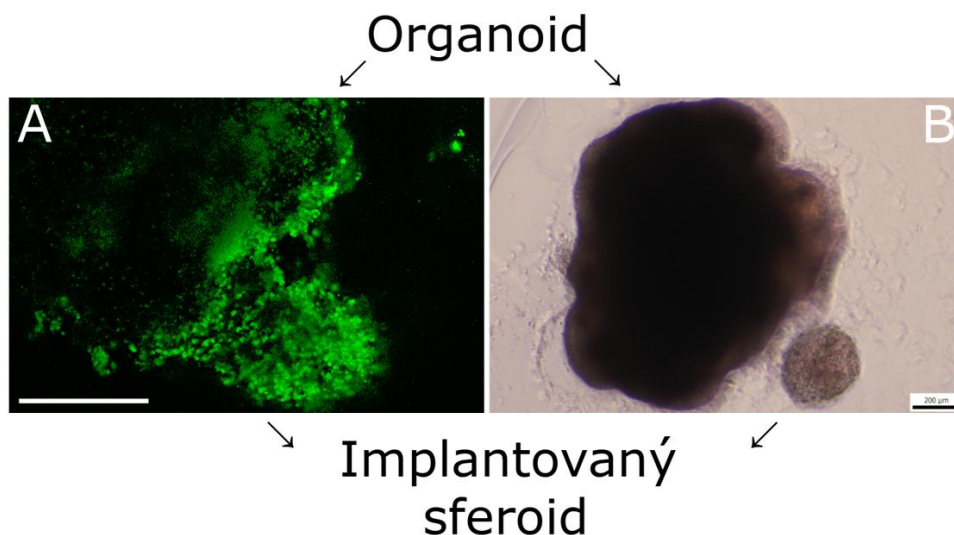
## 5.8 Charakterizace mechanismu působení komplexu Ir4 na modelu implantátu sféroid-organoid

Cerebrální organoidy představují techniku vytváření 3D modelů odvozených z kmenových buněk, které napodobují specifické struktury a fyziologické funkce tkáně lidského mozku. Umožňují tedy modelovat mnoho závažných onemocnění a složitějších situací dříve studovaných pouze za podmínek *in vivo*, bez vyvolání etických problémů [133], [134]. Využití mozkových organoidů usnadňuje screening a zkoumání účinků protirakovinných sloučenin na zdravou i nemocnou tkáň mozku, stejně jako predikci potenciálních terapeutických intervencí [135].

Výsledky provedených testů reprezentují působivou aktivitu komplexu Ir4 vůči sféroidům lidského glioblastomu U87MG (Tabulka 1). Tyto závěry ovšem neznamenají nutně systémový úspěch v klinických aplikacích této látky. Právě v případě testování komplexu za *in vivo* podmínek nejčastěji dochází k ovlivnění nebo celkové změně aktivity protirakovinných léků. Z tohoto důvodu jsme do této práce zařadili i testování účinnosti studovaného komplexu ve fúzním systému, složeného z maligní tkáně (sféroid U87MG) implantované do nezhoubné tkáně reprezentované cerebrálními organoidy odvozenými z lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (hiPSC). Tento komplexní systém byl následně zabudován do obalu formovaného z Matrigelu<sup>®</sup>, který zafixoval vytvořený 3D model a umožnil nám provádět pohodlnou manipulaci se vzorky, analýzu a zpracování vzorků (více podrobností viz. MATERIÁLY A METODY). Připravené fúzní systémy nám umožnily sledovat distribuci testovaných sloučenin, léčebné účinky komplexu na zdravou mozkovou tkáň (nežádoucí účinky) a invazi nádorů do zdravé tkáně za podmínek srovnatelných s *in vivo* podmínkami.

### 5.8.1 Studium distribuce komplexu Ir4 ve fúzním systému

Distribuce podané sloučeniny Ir4 byla ve fúzním systému popsáném výše stanovená pomocí konfokální mikroskopie. Komplex Ir4 se převážně akumuloval v maligní tkáni sféroidu glioblastomu (Obrázek 34). Ovšem přesto bylo možné pozorovat zvýšení fluorescenčního signálu poskytovaného látkou Ir4 i na periferii mozkového nemaligního organoidu. Tato zjištění jsou v souladu se závěry pozorování buněčné akumulace v kokultivačním modelu BBB, kdy byla stanovena převládající akumulace komplexu Ir4 v buňkách glioblastomu U87MG (Tabulka 3). Zároveň bylo již v tomto experimentu také nastíněno, že se částečně akumuluje komplex Ir4 i do nemaligních buněk (kultury hCMEC/D3), na které nepůsobí cytotoxicky. Selektivní akumulace Ir4 v nádorové tkáni přispívá k její potencionální aplikaci nejen jako účinné látky pro fotodynamickou terapii (PDT), ale také jako vhodného kandidáta používaného při fluorescenčně řízené PDT kooperativní resekci glioblastomu [158]. Fluorescenčně řízená resekce nádoru představuje techniku využívající intraoperační fluorescenční vizualizaci tkáně maligního gliomu, která zvýší kontrast tumoru a umožňuje chirurgům dosáhnout výrazně vyššího počtu kompletních resekcí maligních gliomů ve srovnání s konvenčními resekci prováděnými bez fluorescenčního kontrastování [159].



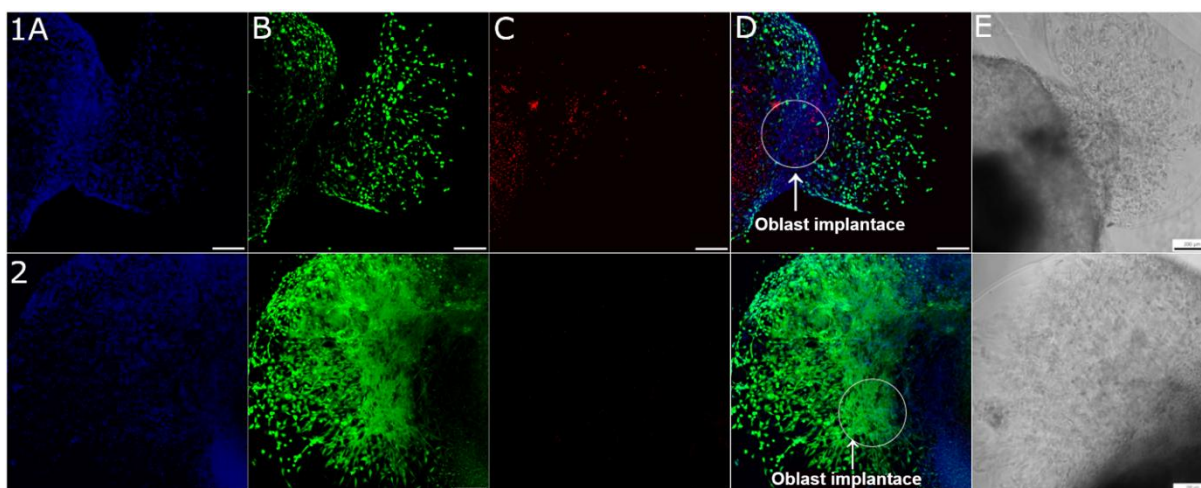
Obrázek 34: Snímky fúzních modelů pořízené pomocí konfokálního mikroskopu (panel A), které vizualizují fluorescenční signál emitovaný testovanou sloučeninou Ir4, a optického mikroskopu, který poskytuje pohled na strukturální charakteristiky modelového systému. Měřítka představuje 200  $\mu\text{m}$ .

### 5.8.2 Účinky léčby Ir4 v kombinaci s fotodynamickou terapií na modelu implantátu cerebrálního organoid-glioblastom

Pro získání více informací a lepší představě o přímých důsledcích léčby mozkových nádorů pomocí komplexu Ir4 v kombinaci s následným ozářením modrým světlem byly výše popsány fúzní systémy obarveny různými fluorescenčními sodami. Po ošetření fúzního systému sloučeninou Ir4 byla cíleně ozářena pouze oblast implantátu U87MG a kontaktní periferie, kde se glioblastom připojuje k organoidu. Tento způsob terapie nám umožňuje cílit pouze na maligní tkáň a minimalizovat negativní dopad na nezhoubnou tkáň. Následně byly vzorky ponechány po dobu 120 hodin za podmínek bez léčiva. Použité časové rozmezí ponechání vzorků ve „drug free“ stavu bylo zvoleno tak, aby bylo možné sledovat účinky léčby pomocí Ir4 v delším časovém horizontu. Toto období poskytuje dostatek času ošetřeným buňkám glioblastomu k potenciální invazi, proliferaci a rekonstrukci nádoru, a tím umožňuje realističtější posouzení dopadu aplikované terapie v tomto komplexním systému. Po uplynutí zvolené inkubační doby od ošetření byly vzorky obarveny Hoechst 33258 (Obrázek 35; panel A), kalceinem AM (Obrázek 35; panel B) a PI (Obrázek 35; panel C) a vizualizovány pomocí konfokální mikroskopie.

Po uplynutí 120 hodin od ozáření byly pozorovány zásadní rozdíly mezi ošetřenými vzorky a neléčenými kontrolami, a to zejména v případě fluorescenční sondy Kalcein AM (analýza metabolicky aktivních živých buněk). Z pořízených snímků (fluorescenčních snímků z konfokálního mikroskopu i snímků ve světlém poli z inverzního mikroskopu) je patrné, že v případě neošetřených kontrol (Obrázek 35, panely 2) dochází k invazivnímu šíření nádorových buněk implantovaného glioblastomu nejen do beztkáňového prostoru představovaného obalem z Matrigelu, ale i do vzdálenější mozkové tkáně organoidu. U těchto vzorků dochází k úplné ztrátě jasného rozhraní mezi implantovaným sferoidem a nenádorovým organoidem. Zároveň vykazovaly neošetřené vzorky (Obrázek 35; snímek 2B) významně vyšší

metabolickou aktivitu než vzorky ošetřené komplexem Ir4 a selektivně ozařované laserovým světlem (Obrázek 35, panel 2B). V případě ošetřených vzorků můžeme vidět zachované ostré rozhraní mezi původní nádorovou a nenádorovou tkání. Po terapii byla v místě implantace sferoidu detekována pouze minimální až téměř nulová metabolická aktivita maligních buněk. Tyto výsledky naznačují, že k šíření nádoru dochází z okolních zbylých maligních buněk, které nebyly zcela eliminovány během ozáření v ošetřených vzorcích. Tento jev je zcela běžně pozorován za klinických podmínek, kdy malá populace glioblastomových buněk nepodlehne aplikované léčbě nebo ozáření a v krátkém časovém intervalu opět proliferuje a zakládá nová nádorová ložiska či metastázy [11], [14]. Je však důležité poznamenat, že progresse nádoru pozorovaná u ošetřených vzorků je výrazně nižší než u neošetřených kontrol. Úprava léčebného plánu, zahrnující zvažování opakované aplikace nebo kombinace této sloučeniny s jinými přístupy, jako je gama ozáření nebo chirurgický zákrok, může tento problém vyřešit a minimalizovat přítomnost reziduálních maligních buněk.



Obrázek 35: Analýza účinnosti aplikované léčby využívající kombinaci komplexu Ir4 se selektivním ozáření sferoidu modrým laserovým světlem (panely 1) v porovnání s neošetřenou kontrolou (panely 2) hodnocena ve stanoveném časovém intervalu (120 hodin) od zákroku. Měřítko představuje 200  $\mu\text{m}$ .

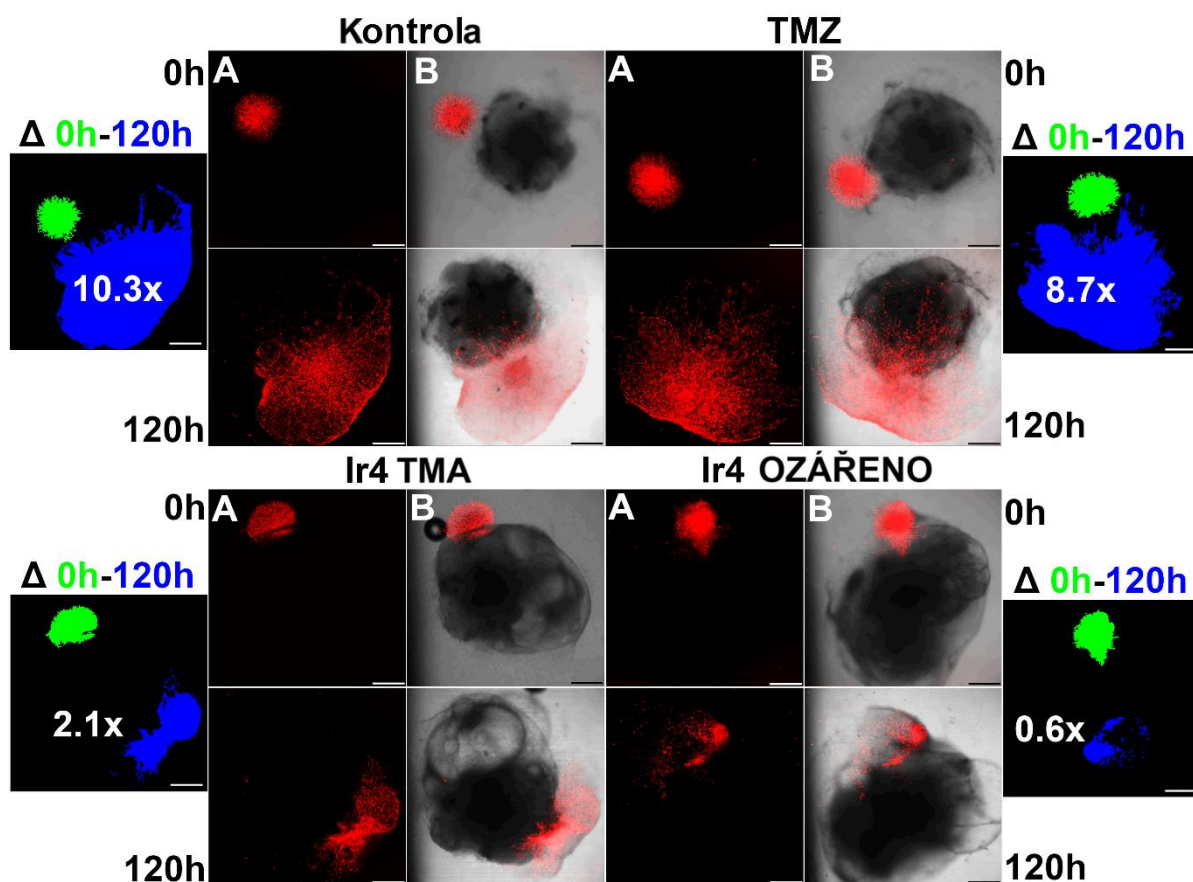
### 5.8.3 Analýza růstu a migrace glioblastomu do zdravé tkáně po aplikované léčbě komplexem Ir4 v kombinaci s ozařováním

Glioblastom patří mezi velmi obtížně léčitelné malignity především kvůli jeho difúznímu růstu a invazivní povaze, které mu umožňují infiltrovat blízkou neurální parenchymální tkáň a účinně odolávat konvenční terapii [21]. Běžně používané konvenční modely pro výzkum nádorů, jako jsou buněčné kultury *in vitro* a zvířecí modely *in vivo*, vykazují významná omezení při vývoji a optimalizaci terapeutických činidel využívaných při léčbě glioblastomu. Pro podrobnější studium proliferace a migrace glioblastomu došlo k vývoji nových vhodnějších preklinických modelů, které poskytují hlubší vhled do komplexních signálních drah tohoto nádorového onemocnění a hrají zásadní roli ve zvýšení terapeutické účinnosti. Přestože bylo pomocí nových preklinických modelů identifikováno mnoho slibných terapeutických strategií, všechny bohužel vykazovaly pouze omezenou účinnost či úplné selhání ve fázi klinického hodnocení. Dosavadní nenalezení účinné terapie pouze zdůrazňuje naléhavou

potřebu přehodnotit design aktuálně dostupných a prozkoumat spolehlivost nových preklinických modelů. Využití dobře charakterizovaných a standardizovaných modelů by mohlo pomoci při překonání překážek mezi slibnými preklinickými léčebnými přístupy a klinickým selháním [53], [54]. Nedávné pokroky v technologii organoidů způsobily revoluci v preklinických modelech pro studium glioblastomu a nabídly platformu pro modelování složité buněčné dynamiky pozorované pouze za *in vivo* podmínek [160]. Zkoumáním chování glioblastomových buněk v komplexním mikroprostředí mozkových organoidů se snažíme odhalit mechanismy, které jsou základem progresu nádoru a interakce se zdravou mozkovou tkání. Pro tento systém modelu implantátu byly použity buňky U87MG-RFP produkující červený fluorescenční protein (RFP), který umožnil sledovat přesnou lokalizaci, diseminaci, migraci a infiltraci nádorové tkáně do organoidu. Tento model nám pomohl lépe porozumět chování glioblastomu a jeho reakci na terapeutické intervence.

Pro tuto studii byl využit stejný experimentální design využívaný v předchozích pokusech s fúzními systémy. Předem vytvořené sferoidy z buněk U87MG-RFP byly implantovány do zdravé tkáně reprezentované cerebrálním organoidem. Celý systém byl následně zapuštěn do Matrigelu a kultivován dalších 24 hodin, aby došlo ke stabilizaci maligní i nemaligní tkáně a k zahájení proliferace a migrace implantátu glioblastomu. Po počáteční kokultivaci byly vzorky podrobeny 3-hodinovému ošetření temozolomidem (100  $\mu\text{M}$ ; běžně používané alkylační činidlo při léčbě mozkových nádorů, [140], [141]) nebo sloučeninou Ir4 (2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50}$ ,  $3\text{D}$ , ozářeno, 72h). Dále byly konfokální mikroskopií zachyceny počáteční stavy a vzorky určené k ozáření byly selektivně exponovány v modrém laserovém světle. Poté byly vzorky přeneseny do čerstvého média (bez léčiva) a po 120hodinové kultivaci opět vizualizovány konfokální mikroskopií. K přesné vizualizaci všech buněk exprimujících RFP v systému sféroidů a organoidů bylo použito zobrazování objemu pomocí skenování vrstev.

Pořízené snímky byly kvantifikovány pomocí softwaru ImageJ a pro každý vzorek byla změřena oblast šíření glioblastomu (Obrázek 36, panel A). K nejvýznamnějšímu šíření glioblastomu došlo v případě kontrolních (neléčených, ozářených) vzorků, kdy se oblast tumoru po uplynutí 120 hodin od ozáření zvýšila 10,3násobně. Tyto výsledky reprezentují rychlý difuzní růst a invazivní povahu glioblastomu, které ztěžují její terapii. Zásadní diseminace glioblastomu do zdravé tkáně byla také pozorována u vzorků ošetřených TMZ, které vykazovaly 8,7násobné zvýšení oblasti glioblastomu. V případě TMZ došlo pouze k mírnému ovlivnění proliferace tumoru ve srovnání s kontrolou. Tyto závěry korelují s rezistencí glioblastomu k TMZ pozorovanou v klinických podmínkách, kdy po aplikované léčbě dochází u pacientů k opětovné proliferaci nádoru [138], [143], [161]. Vzorky ošetřené komplexem Ir4 vykazovaly značné zpomalení šíření glioblastomu, přičemž jeho plocha se po uplynutí 120-ti hodinového intervalu zvýšila pouze 2,1krát. Je důležité poznamenat, že po aplikaci studovaného komplexu i za podmínek bez ozařování došlo k zásadnímu zmenšení oblasti šíření nádoru ve srovnání s konvenčním ošetřením TMZ, a to až 4násobně, přestože byla použita 50-krát nižší koncentrace Ir4 než TMZ. Kombinace Ir4 se selektivním ozařováním modrým laserem prokázala působivé potlačení diseminace glioblastomu. V tomto případě došlo ke zmenšení plochy obsazené buňkami U87MG-RFP na 0,6-ti násobek původní velikosti, což ukazuje na významné zredukování plochy původního implantátu.



Obrázek 36: Analýza účinnosti aplikované léčby na růst a migraci buněk U87MG-RFP do cerebrálního organoidu zobrazená pomocí fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční kanál-vizualizace buněk U87MG-RFP (panely A), překryvu světlého pole s fluorescenčním kanálem (panely B) a porovnáním časově závislé změny oblasti výskytu buněk U87MG (panely  $\Delta$ ). Měřítko představuje 500  $\mu\text{m}$ .

Pro lepší porovnání účinků aplikované léčby a ozáření na zdravou mozkovou tkáň, byly objemy organoidů v příslušných vzorcích kvantifikovány pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem nebo zobrazování ve světlém poli konfokální mikroskopii. Při kvantifikaci byly ručně vymezeny oblasti zájmu (ROI) před a po uplynutí 120 hodin od ošetření. Ze získaných dat vyplývá, že v případě všech ošetřených vzorků i neléčených kontrol byl pozorován růst organoidu. Všechny organoidy vykazovaly po 120 hodinách zvýšení plochy přibližně o 21-25%. Tedy ani konvenční léčba TMZ (21% růst organoidů), ani experimentální přístup využívající sloučeninu Ir4 (24% růst organoidů) nevykazovaly žádnou změnu v proliferaci mozkové tkáně, a tedy nepůsobí žádnou akutní vedlejší toxicitu na zdravou tkáň ve srovnání s neošetřenou kontrolou (25% růst organoidů).

Naše zjištění zdůrazňují potenciál sloučeniny Ir4 jako možného budoucího cytostatika, které významně omezí šíření glioblastomu do okolní tkáně, a to i při aplikaci řádově nižších koncentrací, než jsou využívány při konvenční léčbě. Nepřítomnost akutní vedlejší toxicity na zdravou tkáň dále zdůrazňuje ambice použitého experimentálního přístupu při vývoji účinnějších terapeutických strategií pro boj s touto agresivní formou rakoviny mozku.

## 6 ZÁVĚR

Chemoterapie cerebrálních nádorů představuje jednu z výzev současné onkologie, a to především kvůli omezenému transportu chemoterapeutických léků přes BBB do maligního ložiska. Přestože existuje několik velmi úspěšných protinádorových metalofarmak vhodných pro léčbu některých mozkových nádorů, jejich použití je velmi vzácné a v současné době prakticky neexistuje v klinické praxi žádný lék na bázi kovu, který by se při terapii karcinomu mozku používal. Cílem mé práce bylo identifikovat ze skupiny iridiových komplexů vhodného kandidáta pro cílenou terapii mozkových nádorů. Konkrétně se jednalo o jeden nově připravený a devět dříve studovaných oktaedrických fosforeskujících iridiových komplexů s obecným vzorcem  $[\text{Ir}(\text{tpty})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{PF}_6$ , nesoucí terdentátní tpty ligand a  $\text{C}^{\wedge}\text{N}$  ligand založený na deprotonovaném 2-arylbenzimidazolovém základním řetězci, které účinně inhibují metastatické procesy u tripl-negativního karcinomu prsu. Zaměřili jsme se především na antiproliferační působení a fotoaktivaci zkoumaných komplexů v široké škále maligních i nenádorových buněčných modelech, transport studovaných sloučenin přes BBB, a také na dlouhodobou účinnost testovaných látek na životaschopnost maligních buněk. Hlavní výsledky lze shrnout do následujících bodů.

Při studii antiproliferační aktivity studovaných komplexů, byly naměřené hodnoty  $\text{IC}_{50}$  všech sloučenin v řádech jednotek až desítek mikromolů pro 2D i 3D buněčné modely. Po ozáření modrým světlem vykazovaly všechny testované látky výrazně lepší cytotoxickou aktivitu a hodnoty  $\text{IC}_{50}$  poklesly na mikro- až submikromolární. Zkoumané komplexy tedy vykazují vyšší účinnost než klinicky využívané léčivo Temozolomid. Provedené testy dále prokázaly, že komplexy Ir3-Ir5 a Ir10 vykazují po fotoaktivaci zvýšenou katalytickou fotooxidací NADH a produkci reaktivních forem kyslíku ( $1\text{O}_2$  a/nebo  $\bullet\text{OH}$ ), které přispívají ke snížení metabolické aktivity a indukci buněčné smrti maligních buněk glioblastomu.

Z výsledků vyplývá, že zejména komplex Ir4  $[\text{Ir}(\text{tpty})(\text{C}^{\wedge}\text{N})\text{Cl}]\text{PF}_6$ , obsahující deprotonovaný methyl 1-butyl-2-fenylbenzimidazolkarboxylátový ligand, vykazoval bez fotoaktivace nízkou antiproliferační aktivitu, která se po ozáření modrým světlem výrazně zvýšila. Sloučenina Ir4 tedy působí selektivní rychlou a trvalou fototoxicitu zprostředkovanou zvýšenou produkcí ROS. Experimenty provedené se samotnými i zapouzdřenými 3D sféroidy do matrice prokázaly, že přítomnost ECM zásadně ovlivňuje účinnost a celkovou buněčnou odpověď na aplikovanou léčbu projevující se ve změnách metabolické aktivity buněk a morfologii sféroidu. Důležitou vlastností všech chemoterapeutik používaných při léčbě cerebrálních nádorů je jejich schopnost pronikat přes hematoencefalickou bariéru, která byla v této studii hodnocena a zkoumána pomocí různých *in vitro* BBB modelů. Komplex Ir4 prokázal jedinečnou schopnost účinně pronikat přes BBB, aniž by došlo k narušení její permeability. Zároveň bylo potvrzeno, že přestože je poměrně významné množství Ir4 absorbováno buňkami BBB majoritně stále převládá buněčný příjem buněk glioblastomu. Ovšem v klinické praxi by toto snížení přijaté terapeutické dávky mohlo významně ovlivnit účinnost léčby.

Pozitivní efekt testovaného komplexu stanovený pouze na základních 2D a 3D buněčných modelech nutně nepotvrzuje jeho vliv na tumor v organismu pacienta. Z tohoto důvodu jsme

účinky této multifunkční terapeutické metody umožňující cílené ošetření malignity zkoumali v komplexním fúzním systému složeném z nemaligních cerebrálních organoidů odvozených z hiPSC buněk a sféroidů vytvořených z maligních U87MG buněk. Fúzní systém představuje cennou platformu, která umožňuje modelovat mnoho složitých situací dříve studovaných pouze za *in vivo* podmínek, jako sledování distribuce zkoumaných sloučenin, účinků léčby na zdravou mozkovou tkáň a šíření nádoru do tkáně.

Pomocí fúzního systému jsme prokázali selektivní akumulaci Ir4 v nádorové tkáni. Tyto informace zvyšují potenciál jeho využití nejen jako účinného činidla pro PDT, ale také jako vhodné chemické substance pro fluorescenčně řízenou PDT kooperativní resekci glioblastomu. Na fúzním modelu byly také studovány i dlouhodobé účinky aplikované léčby Ir4 v kombinaci s PDT, které umožnily realističtější posouzení celkového dopadu terapeutického přístupu na komplexní systém a studium vzniku a migrace recidiv glioblastomu do nenádorové tkáně. Pozorovaná progresse malignit byla v ošetřených modelech značně nižší než u neošetřených vzorků, což potvrzuje potenciál multifunkční terapeutické metody inhibovat šíření nádoru. Přesto přítomnost reziduálních maligních buněk naznačuje částečný neúspěch a nutnost optimalizace léčebné strategie, zahrnující opakovanou aplikaci terapie nebo její kombinaci s jinými vhodnými přístupy řešícími tento problém a minimalizujícími přítomnost reziduálních maligních buněk.

Z výše prezentovaných závěrů vyplývá, že komplex Ir4 představuje potenciální nadějně terapeutické činidlo, které účinně inhibuje šíření glioblastomu a potenciálně by mohlo působit méně nežádoucích účinků na organismus pacienta. Ovšem zároveň tato práce také zdůrazňuje nutnost další optimalizace jeho použití pro terapii solidních nádorů mozku.

## 7 REFERENCE

- [1] WU, Song, Wei ZHU, Patricia THOMPSON a Yusuf A HANNUN. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nature Communications* [online]. 2018, 9(1) [cit. 2023-04-05]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-05467-z.
- [2] COOPER, Geoffrey. The Development and Causes of Cancer. In: *The Cell: A Molecular Approach* [online]. 2nd edition. Sinauer Associates, 2000 [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-0878931064. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>.
- [3] MCGUIGAN, Andrew, Paul KELLY, Richard C TURKINGTON, Claire JONES, Helen G COLEMAN a R Stephen MCCAIN. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2018, 24(43), 4846-4861 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v24.i43.4846.
- [4] DARASHAN, U S; MEGHA, V R; HAMSAVENI, G; DARSHAN, N; MANJUNATHA, G R et al. An updated review on Brain Tumour. *Online. Journal of Integral Sciences*. 2023, s. 42-52. ISSN 2581-5679. Dostupné z: <https://doi.org/10.37022/jis.v6i2.55>. [cit. 2025-04-24].
- [5] LAQUINTANA, Valentino; TRAPANI, Adriana; DENORA, Nunzio; WANG, Fan; GALLO, James M et al. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Online. Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009, roč. 6, č. 10, s. 1017-1032. ISSN 1742-5247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/17425240903167942>. [cit. 2025-03-13].
- [6] ALDAPE, Kenneth; BRINDLE, Kevin M.; CHESLER, Louis; CHOPRA, Rajesh; GAJJAR, Amar et al. Challenges to curing primary brain tumours. *Online. Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019, roč. 16, č. 8, s. 509-520. ISSN 1759-4774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0177-5>. [cit. 2025-03-13].
- [7] SHAPIRO, William R. Current Therapy for Brain Tumors. *Online. Archives of Neurology*. 1999, roč. 56, č. 4. ISSN 0003-9942. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/archneur.56.4.429>. [cit. 2025-03-13].
- [8] RASHEED, Sumbal; REHMAN, Kanwal a AKASH, Muhammad Sajid Hamid. An insight into the risk factors of brain tumors and their therapeutic interventions. *Online*. 2021, roč. 143. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112119>. [cit. 2025-03-13].
- [9] DELAIDELLI, Alberto a MOIRAGHI, Alessandro. Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Brain Tumors. *Online. Brain Sciences*. 2024, roč. 14, č. 3. ISSN 2076-3425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/brainsci14030224>. [cit. 2025-03-13].
- [10] PASUPULETI, Vasavi; VORA, Lalitkumar; PRASAD, Renuka; NANDAKUMAR, D.N. a KHATRI, Dharmendra Kumar. Glioblastoma preclinical models: Strengths and weaknesses. *Online. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2024,

- roč. 1879, č. 1. ISSN 0304419X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189059>. [cit. 2025-04-01].
- [11] HAMBARDZUMYAN, Dolores a BERGERS, Gabriele. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. Online. Trends in Cancer. 2015, roč. 1, č. 4, s. 252-265. ISSN 24058033. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.10.009>. [cit. 2025-04-01].
- [12] OHGAKI, Hiroko a KLEIHUES, Paul. Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas. Online. 2005, roč. 64, č. 6, s. 479-489. ISSN 0022-3069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jnen/64.6.479>. [cit. 2025-04-01].
- [13] KALLURI, Anita L.; SHAH, Pavan P. a LIM, Michael. The Tumor Immune Microenvironment in Primary CNS Neoplasms: A Review of Current Knowledge and Therapeutic Approaches. Online. International Journal of Molecular Sciences. 2023, roč. 24, č. 3. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms24032020>. [cit. 2025-03-20].
- [14] DAVIS, Mary. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Online. Clinical Journal of Oncology Nursing. 2016, roč. 20, č. 5, s. S2-S8. ISSN 1092-1095. Dostupné z: <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>. [cit. 2025-04-01].
- [15] GROCHANS, Szymon; CYBULSKA, Anna Maria; SIMIŃSKA, Donata; KORBECKI, Jan; KOJDER, Klaudyna et al. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. Online. Cancers. 2022, roč. 14, č. 10. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>. [cit. 2025-04-01].
- [16] Location and prevalence of glioblastomas in the central nervous system (CNS). Online. In: Personalize My Medicine. Dostupné z: <https://personalizemymedicine.com/2023/02/07/glioblastoma-current-therapies-and-recent-therapeutic-advances/>. [cit. 2025-04-24].
- [17] DELGADO-MARTÍN, Belén a MEDINA, Miguel Ángel. Advances in the Knowledge of the Molecular Biology of Glioblastoma and Its Impact in Patient Diagnosis, Stratification, and Treatment. Online. Advanced Science. 2020, roč. 7, č. 9. ISSN 2198-3844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/advs.201902971>. [cit. 2025-04-01].
- [18] BONDY, Melissa L.; SCHEURER, Michael E.; MALMER, Beatrice; BARNHOLTZ-SLOAN, Jill S.; DAVIS, Faith G. et al. Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. Online. Cancer. 2008, roč. 113, č. S7, s. 1953-1968. ISSN 0008543X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cncr.23741>. [cit. 2025-03-20].
- [19] PARK, Deric M. a RICH, Jeremy N. Biology of Glioma Cancer Stem Cells. Online. Molecules and Cells. 2009, roč. 28, č. 1, s. 7-12. ISSN 10168478. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0111-2>. [cit. 2025-04-01].

- [20] URBAŃSKA, Kaja; SOKOŁOWSKA, Justyna; SZMIDT, Maciej a SYSA, Paweł. Review Glioblastoma multiforme – an overview. Online. *Współczesna Onkologia*. 2014, roč. 5, s. 307-312. ISSN 1428-2526. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>. [cit. 2025-04-01].
- [21] RODA, Domingos; VEIGA, Pedro; MELO, Joana Barbosa; CARREIRA, Isabel Marques a RIBEIRO, Ilda Patrícia. Principles in the Management of Glioblastoma. Online. *Genes*. 2024, roč. 15, č. 4. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/genes15040501>. [cit. 2025-04-01].
- [22] LIN, Hao; LIU, Chaxian; HU, Ankang; ZHANG, Duanwu; YANG, Hui et al. Understanding the immunosuppressive microenvironment of glioma: mechanistic insights and clinical perspectives. Online. 2024, roč. 17, č. 1. ISSN 1756-8722. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13045-024-01544-7>. [cit. 2025-03-20].
- [23] BRAY, Freddie; LAVERSANNE, Mathieu; SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Online. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2024, roč. 74, č. 3, s. 229-263. ISSN 0007-9235. Dostupné z: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>. [cit. 2025-04-01].
- [24] KHALIGHI, Sirvan; REDDY, Kartik; MIDYA, Abhishek; PANDAV, Krupal Balvantbhai; MADABHUSHI, Anant et al. Artificial intelligence in neuro-oncology: advances and challenges in brain tumor diagnosis, prognosis, and precision treatment. Online. *Npj Precision Oncology*. 2024, roč. 8, č. 1. ISSN 2397-768X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41698-024-00575-0>. [cit. 2025-03-20].
- [25] ILIC, Irena a ILIC, Milena. International patterns and trends in the brain cancer incidence and mortality: An observational study based on the global burden of disease. Online. *Heliyon*. 2023, roč. 9, č. 7. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18222>. [cit. 2025-04-01].
- [26] SABOURI, Masih; DOGONCHI, Aref Famili; SHAFIEI, Mehdi a TEHRANI, Donya Sheibani. Survival rate of patient with glioblastoma: a population-based study. Online. *Egyptian Journal of Neurosurgery*. 2024, roč. 39, č. 1. ISSN 2520-8225. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s41984-024-00294-5>. [cit. 2025-04-01].
- [27] HANIF, Farina; MUZAFFAR, Kanza a PERVEEN, Kahkashan. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Online. 2017, roč. 18, č. 1, s. 3-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>. [cit. 2025-04-01].
- [28] ANTONICA, Francesco; AIELLO, Giuseppe; SOLDANO, Alessia; ABBALLE, Luana; MIELE, Evelina et al. Modeling Brain Tumors: A Perspective Overview of in vivo and Organoid Models. Online. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022, roč. 15. ISSN 1662-5099. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.818696>. [cit. 2025-03-20].

- [29] ELLOR, Susan V.; PAGANO-YOUNG, Teri Ann a AVGEROPOULOS, Nicholas G. Glioblastoma: Background, Standard Treatment Paradigms, and Supportive Care Considerations. Online. 2014, roč. 42, č. 2, s. 171-182. ISSN 1073-1105. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jlme.12133>. [cit. 2025-04-01].
- [30] ARULMANI, Dhiyana a MANICKAM, Rajapriya. Brain Tumors. Online. Journal of Student Research. 2024, roč. 13, č. 2. ISSN 2167-1907. Dostupné z: <https://doi.org/10.47611/jsrhs.v13i2.6694>. [cit. 2025-04-01].
- [31] RAJARATNAM, Vilashini; ISLAM, Mohammad; YANG, Maixee; SLABY, Rachel; RAMIREZ, Hilda et al. Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. Online. Cancers. 2020, roč. 12, č. 4. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers12040937>. [cit. 2025-04-01].
- [32] SHAH, Ashish H. a HEISS, John D. Neurosurgical Clinical Trials for Glioblastoma: Current and Future Directions. Online. Brain Sciences. 2022, roč. 12, č. 6. ISSN 2076-3425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/brainsci12060787>. [cit. 2025-04-25].
- [33] GARDAM, Bryan; GARGETT, Tessa; BROWN, Michael P. a EBERT, Lisa M. Targeting the dendritic cell-T cell axis to develop effective immunotherapies for glioblastoma. Online. Frontiers in Immunology. 2023, roč. 14. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1261257>. [cit. 2025-04-25].
- [34] GILARD, Vianney; TEBANI, Abdellah; DABAJ, Ivana; LAQUERRIÈRE, Annie; FONTANILLES, Maxime et al. Diagnosis and Management of Glioblastoma: A Comprehensive Perspective. Online. Journal of Personalized Medicine. 2021, roč. 11, č. 4. ISSN 2075-4426. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jpm11040258>. [cit. 2025-04-01].
- [35] RAO, Rohan; PATEL, Anjali; HANCHATE, Kunal; ROBINSON, Eric; EDWARDS, Aniela et al. Advances in Focused Ultrasound for the Treatment of Brain Tumors. Online. Tomography. 2023, roč. 9, č. 3, s. 1094-1109. ISSN 2379-139X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/tomography9030090>. [cit. 2025-04-01].
- [36] YALAMARTY, Satya Siva Kishan; FILIPCZAK, Nina; LI, Xiang; SUBHAN, Md Abdus; PARVEEN, Farzana et al. Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). Online. Cancers. 2023, roč. 15, č. 7. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers15072116>. [cit. 2025-04-03].
- [37] ANGOM, Ramcharan Singh; NAKKA, Naga Malleswara Rao a BHATTACHARYA, Santanu. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. Online. Brain Sciences. 2023, roč. 13, č. 11. ISSN 2076-3425. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/brainsci13111536>. [cit. 2025-04-03].
- [38] CHEN, Xi; CUI, Yi a ZOU, Liqun. Treatment advances in high-grade gliomas. Online. Frontiers in Oncology. 2024, roč. 14. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1287725>. [cit. 2025-04-03].

- [39] HART, Michael G; GARSIDE, Ruth; ROGERS, Gabriel; STEIN, Ken a GRANT, Robin. Temozolomide for high grade glioma. Online. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2016, roč. 2016, č. 9. ISSN 14651858. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007415.pub2>. [cit. 2025-04-03].
- [40] KEIME-GUIBERT, Florence; CHINOT, Olivier; TAILLANDIER, Luc; CARTALAT-CAREL, Stéphanie; FRENAY, Marc et al. Radiotherapy for Glioblastoma in the Elderly. Online. New England Journal of Medicine. 2007, roč. 356, č. 15, s. 1527-1535. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065901>. [cit. 2025-04-03].
- [41] CHEN, Sunhui; QIU, QiuJun; WANG, Dongdong; SHE, Dejun; YIN, Bo et al. Long acting carmustine loaded natural extracellular matrix hydrogel for inhibition of glioblastoma recurrence after tumor resection. Online. Frontiers of Chemical Science and Engineering. 2022, roč. 16, č. 4, s. 536-545. ISSN 2095-0179. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11705-021-2067-5>. [cit. 2025-04-05].
- [42] PENA, Erik S.; GRAHAM-GURYSH, Elizabeth G.; BACHELDER, Eric M. a AINSLIE, Kristy M. Design of Biopolymer-Based Interstitial Therapies for the Treatment of Glioblastoma. Online. International Journal of Molecular Sciences. 2021, roč. 22, č. 23. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222313160>. [cit. 2025-04-25].
- [43] ORTIZ, Raúl; PERAZZOLI, Gloria; CABEZA, Laura; JIMÉNEZ-LUNA, Cristina; LUQUE, Raquel et al. Temozolomide: An Updated Overview of Resistance Mechanisms, Nanotechnology Advances and Clinical Applications. Online. Current Neuropharmacology. 2021, roč. 19, č. 4, s. 513-537. ISSN 1570159X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200626204005>. [cit. 2025-04-05].
- [44] DAPASH, Mark; HOU, David; CASTRO, Brandyn; LEE-CHANG, Catalina a LESNIAK, Maciej S. The Interplay between Glioblastoma and Its Microenvironment. Online. Cells. 2021, roč. 10, č. 9. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells10092257>. [cit. 2025-04-20].
- [45] UPTON, Dannielle H.; UNG, Caitlin; GEORGE, Sandra M.; TSOLI, Maria; KAVALLARIS, Maria et al. Challenges and opportunities to penetrate the blood-brain barrier for brain cancer therapy. Online. Theranostics. 2022, roč. 12, č. 10, s. 4734-4752. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/thno.69682>. [cit. 2025-04-20].
- [46] PANDEY, Nikhil; ANASTASIADIS, Pavlos; CARNEY, Christine P.; KANVINDE, Pranjali P.; WOODWORTH, Graeme F. et al. Nanotherapeutic treatment of the invasive glioblastoma tumor microenvironment. Online. Advanced Drug Delivery Reviews. 2022, roč. 188. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114415>. [cit. 2025-04-20].
- [47] SHARMA, Pratibha; AAROE, Ashley; LIANG, Jiyong a PUDUVALLI, Vinay K. Tumor microenvironment in glioblastoma: Current and emerging concepts. Online.

- Neuro-Oncology Advances. 2023, roč. 5, č. 1. ISSN 2632-2498. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad009>. [cit. 2025-04-21].
- [48] DE VISSER, Karin E. a JOYCE, Johanna A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. Online. Cancer Cell. 2023, roč. 41, č. 3, s. 374-403. ISSN 15356108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>. [cit. 2025-04-21].
- [49] HUANG, Huaiyi; BANERJEE, Samya; QIU, Kangqiang; ZHANG, Pingyu; BLACQUE, Olivier et al. Targeted photoredox catalysis in cancer cells. Online. Nature Chemistry. 2019, roč. 11, č. 11, s. 1041-1048. ISSN 1755-4330. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0328-4>. [cit. 2024-11-08].
- [50] GONZALEZ-MOLINA, Jordi; MOYANO-GALCERAN, Lidia; SINGLE, Andrew; GULTEKIN, Okan; ALSALHI, Shno et al. Chemotherapy as a regulator of extracellular matrix-cell communication: Implications in therapy resistance. Online. Seminars in Cancer Biology. 2022, roč. 86, s. 224-236. ISSN 1044579X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.03.012>. [cit. 2024-10-08].
- [51] JANG, Hyun Ji a PARK, Jong-Whi. Microenvironmental Drivers of Glioma Progression. Online. International Journal of Molecular Sciences. 2025, roč. 26, č. 5. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms26052108>. [cit. 2025-04-24].
- [52] GILES, Breanna; NAKHJAVANI, Maryam; WIESA, Andrew; KNIGHT, Tareeqe; SHIGDAR, Sarah et al. Unravelling the Glioblastoma Tumour Microenvironment: Can Aptamer Targeted Delivery Become Successful in Treating Brain Cancers? Online. Cancers. 2023, roč. 15, č. 17. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers15174376>. [cit. 2025-04-24].
- [53] AKTER, Farhana; SIMON, Brennan; DE BOER, Nadine Leonie; REDJAL, Navid; WAKIMOTO, Hiroaki et al. Pre-clinical tumor models of primary brain tumors: Challenges and opportunities. Online. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 2021, roč. 1875, č. 1. ISSN 0304419X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188458>. [cit. 2025-03-11].
- [54] PASUPULETI, Vasavi; VORA, Lalitkumar; PRASAD, Renuka; NANDAKUMAR, D.N. a KHATRI, Dharmendra Kumar. Glioblastoma preclinical models: Strengths and weaknesses. Online. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 2024, roč. 1879, č. 1. ISSN 0304419X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189059>. [cit. 2025-03-11].
- [55] BIJU, Tina Sara; PRIYA, Veeraraghavan Vishnu a FRANCIS, Arul Prakash. Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostics: an updated review. Online. Drug Delivery and Translational Research. 2023, roč. 13, č. 9, s. 2239-2253. ISSN 2190-393X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01327-6>. [cit. 2024-08-30].

- [56] NIU, Xiaodong; ZHANG, Yan a WANG, Yuan. Co-culture models for investigating cellular crosstalk in the glioma microenvironment. Online. *Cancer Pathogenesis and Therapy*. 2024, roč. 2, č. 4, s. 219-230. ISSN 29497132. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cpt.2023.11.002>. [cit. 2025-04-24].
- [57] KAPALCZYŃSKA, Marta; KOLENDA, Tomasz; PRZYBYŁA, Weronika; ZAJĄCZKOWSKA, Maria; TERESIAK, Anna et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. Online. *Archives of Medical Science*. ISSN 1734-1922. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>. [cit. 2024-08-26].
- [58] CACCIAMALI, Andrea; VILLA, Riccardo a DOTTI, Silvia. 3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications. Online. *Frontiers in Physiology*. 2022, roč. 13. ISSN 1664-042X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.836480>. [cit. 2024-08-30].
- [59] EDMONDSON, Rasheena; BROGLIE, Jessica Jenkins; ADCOCK, Audrey F. a YANG, Liju. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. Online. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2014, roč. 12, č. 4, s. 207-218. ISSN 1540-658X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>. [cit. 2024-08-30].
- [60] IUS, Tamara; SOMMA, Teresa; PASQUALETTI, Francesco; BERARDINELLI, Jacopo; VITULLI, Francesca et al. Local therapy in glioma: An evolving paradigm from history to horizons (Review). Online. *Oncology Letters*. 2024, roč. 28, č. 3. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ol.2024.14573>. [cit. 2025-04-24].
- [61] Myungjin Lee J, Mhaweche-Fauceglia P, Lee N, Cristina Parsanian L, Gail Lin Y, Andrew Gayther S, Lawrenson K. 2013. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest*. 93(5):528-542. <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2013.41>.
- [62] GILAZIEVA, Zarema, Aleksei PONOMAREV, Catrin RUTLAND, Albert RIZVANOV a Valeriya SOLOVYEVA. Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine. *Cancers* [online]. 2020, 12(10) [cit. 2023-03-30]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: [doi:10.3390/cancers12102727](https://doi.org/10.3390/cancers12102727).
- [63] KARAKURT, Serdar; DURMUS, Irem Mukaddes; ERTURK, Sureyya; AKALIN, Halime Seyma a BAS, Kemal. Animal Model of Human Cancer: Malignant Lymphoma/Colon Cancer/Lung Cancer/Liver Cancer/Brain Tumors/Skin Cancer. Online. *Handbook of Animal Models and its Uses in Cancer Research*. 2022, s. 1-24. ISBN 978-981-19-1282-5. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-981-19-1282-5\\_13-1](https://doi.org/10.1007/978-981-19-1282-5_13-1). [cit. 2025-04-26].

- [64] LIU, Zhe a SADLER, Peter J. Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts. Online. *Accounts of Chemical Research*. 2014, roč. 47, č. 4, s. 1174-1185. ISSN 0001-4842. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ar400266c>. [cit. 2024-11-08].
- [65] ROMERO-CANELÓN, Isolda a SADLER, Peter J. Next-Generation Metal Anticancer Complexes: Multitargeting via Redox Modulation. Online. *Inorganic Chemistry*. 2013, roč. 52, č. 21, s. 12276-12291. ISSN 0020-1669. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ic400835n>. [cit. 2024-11-08].
- [66] NOVOHRADSKY, Vojtech; MARCO, Alicia; MARKOVA, Lenka; CUTILLAS, Natalia; RUIZ, José et al. Ir(III) Compounds Containing a Terdentate Ligand Are Potent Inhibitors of Proliferation and Effective Antimetastatic Agents in Aggressive Triple-Negative Breast Cancer Cells. Online. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2023, roč. 66, č. 14, s. 9766-9783. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00586>. [cit. 2024-11-08].
- [67] WEI, Li; KUSHWAHA, Rajesh; DAO, Anyi; FAN, Zhongxian; BANERJEE, Samya et al. Axisymmetric bis-tridentate Ir( iii ) photoredox catalysts for anticancer phototherapy under hypoxia. Online. *Chemical Communications*. 2023, roč. 59, č. 21, s. 3083-3086. ISSN 1359-7345. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D2CC06721H>. [cit. 2024-11-08].
- [68] LIU, Bingqing; MONRO, Susan; LI, Zhike; JABED, Mohammed A.; RAMIREZ, Daniel et al. New Class of Homoleptic and Heteroleptic Bis(terpyridine) Iridium(III) Complexes with Strong Photodynamic Therapy Effects. Online. *ACS Applied Bio Materials*. 2019, roč. 2, č. 7, s. 2964-2977. ISSN 2576-6422. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00312>. [cit. 2024-11-08].
- [69] KARAGIANIS, G; HILL, JS; STYLLI, SS; KAYE, AH; VARADAXIS, NJ et al. Evaluation of porphyrin C analogues for photodynamic therapy of cerebral glioma. Online. *British Journal of Cancer*. 1996, roč. 73, č. 4, s. 514-521. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.89>. [cit. 2024-11-08].
- [70] MAHMOUDI, K.; GARVEY, K. L.; BOURAS, A.; CRAMER, G.; STEPP, H. et al. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. Online. *Journal of Neuro-Oncology*. 2019, roč. 141, č. 3, s. 595-607. ISSN 0167-594X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03103-4>. [cit. 2024-11-08].
- [71] PENG, Wan; HEGAZY, Ahmed M.; JIANG, Ning; CHEN, Xi; QI, Hua-Xin et al. Identification of two mitochondrial-targeting cyclometalated iridium(III) complexes as potent anti-glioma stem cells agents. Online. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2020, roč. 203. ISSN 01620134. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110909>. [cit. 2024-11-08].
- [72] YELLOL, Jyoti; PÉREZ, Sergio A.; YELLOL, Gorakh; ZAJAC, Juraj; DONAIRE, Antonio et al. Highly potent extranuclear-targeted luminescent iridium( iii ) antitumor agents containing benzimidazole-based ligands with a handle for functionalization.

- Online. *Chemical Communications*. 2016, roč. 52, č. 98, s. 14165-14168. ISSN 1359-7345. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6CC07909A>. [cit. 2024-11-08].
- [73] NOVOHRADSKY, Vojtech; ZAMORA, Ana; GANDIOSO, Albert; BRABEC, Viktor; RUIZ, José et al. Somatostatin receptor-targeted organometallic iridium(III) complexes as novel theranostic agents. Online. *Chemical Communications*. 2017, roč. 53, č. 40, s. 5523-5526. ISSN 1359-7345. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C7CC01946G>. [cit. 2024-11-08].
- [74] YELLOL, Jyoti; PÉREZ, Sergio A.; BUCETA, Alicia; YELLOL, Gorakh et al. Novel C,N-Cyclometalated Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure–Activity Relationship Study. Online. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, roč. 58, č. 18, s. 7310-7327. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01194>. [cit. 2024-11-08].
- [75] NOVOHRADSKY, Vojtech; ROVIRA, Anna; HALLY, Cormac; GALINDO, Alex; VIGUERAS, Gloria et al. Towards Novel Photodynamic Anticancer Agents Generating Superoxide Anion Radicals III Complex Conjugated to a Far-Red Emitting Coumarin: A Cyclometalated Ir III Complex Conjugated to a Far-Red Emitting Coumarin. Online. *Angewandte Chemie International Edition*. 2019, roč. 58, č. 19, s. 6311-6315. ISSN 1433-7851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.201901268>. [cit. 2024-11-22].
- [76] MURRAY, Kathryn A. a GIBSON, Matthew I. Chemical approaches to cryopreservation. Online. *Nature Reviews Chemistry*. 2005, roč. 6, č. 8, s. 579-593. ISSN 2397-3358. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00407-4>. [cit. 2024-07-01].
- [77] JANG, Tae Hoon; PARK, Sung Choel; YANG, Ji Hyun; KIM, Jung Yoon; SEOK, Jae Hong et al. Cryopreservation and its clinical applications. Online. *Integrative Medicine Research*. 2017, roč. 6, č. 1, s. 12-18. ISSN 22134220. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>. [cit. 2024-07-01].
- [78] JAISWAL, Anurag N a VAGGA, Anjali. Cryopreservation: A Review Article. Online. *Cureus*. ISSN 2168-8184. Dostupné z: <https://doi.org/10.7759/cureus.31564>. [cit. 2024-07-01].
- [79] WHALEY, David; DAMYAR, Kimia; WITEK, Rafal P.; MENDOZA, Alan; ALEXANDER, Michael et al. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. Online. *Cell Transplantation*. 2021, roč. 30. ISSN 0963-6897. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>. [cit. 2024-07-01].
- [80] UHRIG, Markus; EZQUER, Fernando a EZQUER, Marcelo. Improving Cell Recovery: Freezing and Thawing Optimization of Induced Pluripotent Stem Cells. Online. *Cells*. 2022, roč. 11, č. 5. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells11050799>. [cit. 2024-07-01].
- [81] KILBRIDE, Peter a MENEGHEL, Julie. Cryopreservation in Tissue Banking. Online. In: *Essentials of Tissue and Cells Banking*. Cham: Springer International Publishing,

- 2021, s. 109-126. ISBN 978-3-030-71620-2. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-71621-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-71621-9_8). [cit. 2024-09-27].
- [82] DUVAL, Kayla; GROVER, Hannah; HAN, Li-Hsin; MOU, Yongchao; PEGORARO, Adrian F. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. Online. *Physiology*. 2017, roč. 32, č. 4, s. 266-277. ISSN 1548-9213. Dostupné z: <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>. [cit. 2024-08-26].
- [83] WEISKIRCHEN, Sabine; SCHRÖDER, Sarah K.; BUHL, Eva Miriam a WEISKIRCHEN, Ralf. A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. Online. *Cells*. 2023, roč. 12, č. 5. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells12050682>. [cit. 2024-08-08].
- [84] MASTERS, John R a STACEY, Glyn N. Changing medium and passaging cell lines. Online. *Nature Protocols*. 2007, roč. 2, č. 9, s. 2276-2284. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.319>. [cit. 2024-08-08].
- [85] SEGERITZ, Charis-P. a VALLIER, Ludovic. Cell Culture. Online. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2017, s. 151-172. ISBN 9780128030776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>. [cit. 2024-08-08].
- [86] SALINAS-VERA, Yarely M.; VALDÉS, Jesús; PÉREZ-NAVARRO, Yussel; MANDUJANO-LAZARO, Gilberto; MARCHAT, Laurence A. et al. Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. Online. *Frontiers in Oncology*. 2022, roč. 12. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.826113>. [cit. 2024-10-15].
- [87] YOUSAFZAI, Muhammad Sulaiman a HAMMER, John A. Using Biosensors to Study Organoids, Spheroids and Organs-on-a-Chip: A Mechanobiology Perspective. Online. *Biosensors*. 2023, roč. 13, č. 10. ISSN 2079-6374. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios13100905>. [cit. 2024-09-19].
- [88] CHEN, Q. a Y. WANG. The application of three-dimensional cell culture in clinical medicine. *Biotechnology Letters*. 2020, 42(11), 2071-2082. ISSN 0141-5492. Dostupné z: [doi:10.1007/s10529-020-03003-y](https://doi.org/10.1007/s10529-020-03003-y). [cit. 2023-08-30]
- [89] GUPTA, Nilesh, Jeffrey R. LIU, Brijeshkumar PATEL, Deepak E. SOLOMON, Bhuvaneshwar VAIDYA a Vivek GUPTA. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. 2016, 1(1), 63-81. ISSN 2380-6761. Dostupné z: [doi:10.1002/btm2.10013](https://doi.org/10.1002/btm2.10013). [cit. 2023-03-29]
- [90] HOARAU-VÉCHOT, Jessica, Arash RAFII, et al. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(1). ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms19010181](https://doi.org/10.3390/ijms19010181). [cit. 2023-03-29]

- [91] 3D Tumor Spheroid Assay (mono-spheroids). *Reaction Biology*. April-2020. Dostupné z: <https://www.reactionbiology.com/services/cell-based-assays/3d-tumor-spheroid-assay>. [cit. 2023-03-30]
- [92] STRONG, Caroline E.; ZHANG, Jiajing; CARRASCO, Martin; KUNDU, Srikanya; BOUTIN, Molly et al. Functional brain region-specific neural spheroids for modeling neurological diseases and therapeutics screening. Online. *Communications Biology*. 2023, roč. 6, č. 1. ISSN 2399-3642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05582-8>. [cit. 2024-09-12].
- [93] ZANONI, Michele; PICCININI, Filippo; ARIENTI, Chiara; ZAMAGNI, Alice; SANTI, Spartaco et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. Online. *Scientific Reports*. 2016, roč. 6, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep19103>. [cit. 2024-09-12].
- [94] LIN, Ann; GIULIANO, Christopher J.; PALLADINO, Ann; JOHN, Kristen M.; ABRAMOWICZ, Connor et al. Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. Online. *Science Translational Medicine*. 2019, roč. 11, č. 509. ISSN 1946-6234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw8412>. [cit. 2024-09-12].
- [95] LUSTBERG, Maryam B.; KUDERER, Nicole M.; DESAI, Aakash; BERGEROT, Cristiane a LYMAN, Gary H. Mitigating long-term and delayed adverse events associated with cancer treatment: implications for survivorship. Online. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2023, roč. 20, č. 8, s. 527-542. ISSN 1759-4774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00776-9>. [cit. 2024-09-12].
- [96] ROVIRA, Anna; ORTEGA-FORTE, Enrique; HALLY, Cormac; JORDÀ-REDONDO, Mireia; ABAD-MONTERO, Diego et al. Exploring Structure–Activity Relationships in Photodynamic Therapy Anticancer Agents Based on Ir(III)-COUPY Conjugates. Online. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2023, roč. 66, č. 12, s. 7849-7867. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00189>. [cit. 2024-09-12].
- [97] WU, Yanping; LI, Shumeng; CHEN, Yuncong; HE, Weijiang a GUO, Zijian. Recent advances in noble metal complex based photodynamic therapy. Online. *Chemical Science*. 2022, roč. 13, č. 18, s. 5085-5106. ISSN 2041-6520. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1SC05478C>. [cit. 2024-09-12].
- [98] LI, Xingshu; LOVELL, Jonathan F.; YOON, Juyoung a CHEN, Xiaoyuan. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. Online. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020, roč. 17, č. 11, s. 657-674. ISSN 1759-4774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0410-2>. [cit. 2024-09-12].
- [99] MIRETTI, Mariana; GONZÁLEZ GRAGLIA, María Antonella; SUÁREZ, Agustín I. a PRUCCA, César G. Photodynamic therapy for glioblastoma: A light at the end of the

- tunnel. Online. Journal of Photochemistry and Photobiology. 2023, roč. 13. ISSN 26664690. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpap.2023.100161>. [cit. 2024-09-12].
- [100] SRB Cytotoxicity Assay Kit. CEPHAM LIFE SCIENCE [online]. [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: <https://www.cephaml.com/srb-cytotoxicity-assay-kit-colorimetric/>.
- [101] WADMAN, Meredith. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. Online. Science. 2023, roč. 379, č. 6628, s. 127-128. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.adg6276>. [cit. 2024-09-12].
- [102] VICHAI, Vanicha a Kanyawim KIRTIKARA. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols [online]. 2006, 1(3), 1112-1116 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: [doi:10.1038/nprot.2006.179](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179).
- [103] KHALEF, Lefsih; LYDIA, Radja; FILICIA, Khetar a MOUSSA, Berkoud. Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. Online. Cell Biochemistry and Function. 2024, roč. 42, č. 3. ISSN 0263-6484. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cbf.4007>. [cit. 2024-09-19].
- [104] LIPPMANN, Ethan S; AZARIN, Samira M; KAY, Jennifer E; NESSLER, Randy A; WILSON, Hannah K et al. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. Online. Nature Biotechnology. 2012, roč. 30, č. 8, s. 783-791. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nbt.2247>. [cit. 2024-09-19].
- [105] DOTIWALA, A. K.; MCCAUSLAND, C. a SAMRA, N. S. Anatomy, Head and Neck: Blood Brain Barrier. Online. StatPearls Publishing, 2023. PMID: 30137840. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519556/>. [cit. 2024-09-19].
- [106] WU, Di; CHEN, Qi; CHEN, Xiaojie; HAN, Feng; CHEN, Zhong et al. The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. Online. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2023, roč. 8, č. 1. ISSN 2059-3635. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>. [cit. 2024-09-19].
- [107] EIGENMANN, Daniela E; XUE, Gongda; KIM, Kwang S; MOSES, Ashlee V; HAMBURGER, Matthias et al. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood–brain barrier model for drug permeability studies. Online. Fluids and Barriers of the CNS. 2013, roč. 10, č. 1. ISSN 2045-8118. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-33>. [cit. 2024-09-19].
- [108] BURN, Layla; GUTOWSKI, Nicholas a WHATMORE, Jacqueline. The role of astrocytes in brain metastasis at the interface of circulating tumour cells and the blood brain barrier. Online. Frontiers in Bioscience-Landmark. 2021, roč. 26, č. 9. ISSN 2768-6701. Dostupné z: <https://doi.org/10.52586/4969>. [cit. 2024-10-15].
- [109] SRINIVASAN, Balaji; KOLLI, Aditya Reddy; ESCH, Mandy Brigitte; ABACI, Hasan Erbil; SHULER, Michael L. et al. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier

- Model Systems. Online. SLAS Technology. 2015, roč. 20, č. 2, s. 107-126. ISSN 24726303. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>. [cit. 2024-09-19].
- [110] RAUT, Bibek; CHEN, Li-Jiun; HORI, Takeshi a KAJI, Hirokazu. An Open-Source Add-On EVOM® Device for Real-Time Transepithelial/Endothelial Electrical Resistance Measurements in Multiple Transwell Samples. Online. Micromachines. 2021, roč. 12, č. 3. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi12030282>. [cit. 2024-09-19].
- [111] ŁACH, Andrzej; WNUK, Agnieszka a WÓJTOWICZ, Anna Katarzyna. Experimental Models to Study the Functions of the Blood–Brain Barrier. Online. Bioengineering. 2023, roč. 10, č. 5. ISSN 2306-5354. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bioengineering10050519>. [cit. 2024-09-27].
- [112] DEWHIRST, Mark W. a SECOMB, Timothy W. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. Online. Nature Reviews Cancer. 2017, roč. 17, č. 12, s. 738-750. ISSN 1474-175X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.93>. [cit. 2024-09-27].
- [113] QI, Dake; LIN, Haiyang; HU, Bingying a WEI, Yang. A review on in vitro model of the blood-brain barrier (BBB) based on hCMEC/D3 cells. Online. Journal of Controlled Release. 2023, roč. 358, s. 78-97. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.04.020>. [cit. 2024-09-27].
- [114] COLE, Christopher B., Susan BATES a Antonio FOJO. Overview of mechanisms of chemoresistance in ovarian cancer. Overcoming Ovarian Cancer Chemoresistance [online]. Elsevier, 2021, 2021, 25-42 [cit. 2023-03-30]. ISBN 9780128198407. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819840-7.00011-X.
- [115] FABULAS-DA COSTA, Anaëlle; LANDRY, Christophe; DEHOUC, Lucie; SEVIN, Emmanuel; DEHOUC, Marie-Pierre et al. Blood–Brain Barrier In Vitro Models and Their Applications in Toxicology. Online. In Vitro Toxicology Systems. Methods in Pharmacology and Toxicology. 2014, s. 147-166. ISBN 978-1-4939-0520-1. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0521-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0521-8_7). [cit. 2024-09-27].
- [116] PINTO, Bárbara; HENRIQUES, Ana C.; SILVA, Patrícia M. A. a BOUSBAA, Hassan. Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. Online. Pharmaceutics. 2020, roč. 12, č. 12. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121186>. [cit. 2024-10-08].
- [117] PATEL, Niravkumar R; ARYASOMAYAJULA, Bhawani; ABOUZEID, Abraham H a TORCHILIN, Vladimir P. Cancer Cell Spheroids for Screening of Chemotherapeutics and drug-delivery Systems. Online. Therapeutic Delivery. 2015, roč. 6, č. 4, s. 509-520. ISSN 2041-5990. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/tde.15.1>. [cit. 2024-10-08].
- [118] GARNIQUE, Anali del Milagro Bernabe; PARDUCCI, Natália Sudan; DE MIRANDA, Lívia Bassani Lins; DE ALMEIDA, Bruna Oliveira; SANCHES, Leonardo et al. Two-Dimensional and Spheroid-Based Three-Dimensional Cell Culture Systems:

- Implications for Drug Discovery in Cancer. Online. *Drugs and Drug Candidates*. 2024, roč. 3, č. 2, s. 391-409. ISSN 2813-2998. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ddc3020024>. [cit. 2024-10-08].
- [119] HUANG, Jiacheng; ZHANG, Lele; WAN, Dalong; ZHOU, Lin; ZHENG, Shusen et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. Online. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021, roč. 6, č. 1. ISSN 2059-3635. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00544-0>. [cit. 2024-10-08].
- [120] HAN, Se Jik; KWON, Sangwoo a KIM, Kyung Sook. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. Online. *Cancer Cell International*. 2021, roč. 21, č. 1. ISSN 1475-2867. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>. [cit. 2024-10-02].
- [121] SENRUNG, Anna; LALWANI, Sakshi; JANJUA, Divya; TRIPATHI, Tanya; KAUR, Jasleen et al. 3D tumor spheroids: morphological alterations a yardstick to anti-cancer drug response. Online. *In vitro models*. 2023, roč. 2, č. 6, s. 219-248. ISSN 2731-3441. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s44164-023-00059-8>. [cit. 2024-10-02].
- [122] GARNER, D.L. Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm. Online. *Theriogenology*. 2009, roč. 71, č. 1, s. 11-21. ISSN 0093691X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.023>. [cit. 2024-11-14].
- [123] KESSEL, Sarah; CRIBBES, Scott; DÉRY, Olivier; KUKSIN, Dmitry; SINCOFF, Eric et al. High-Throughput 3D Tumor Spheroid Screening Method for Cancer Drug Discovery Using Celigo Image Cytometry. Online. *SLAS Technology*. 2017, roč. 22, č. 4, s. 454-465. ISSN 24726303. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/2211068216652846>. [cit. 2024-10-03].
- [124] ROSENBERG, Merilin; AZEVEDO, Nuno F. a IVASK, Angela. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. Online. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42906-3>. [cit. 2024-10-03].
- [125] MILES, Fayth L.; LYNCH, Jill E. a SIKES, Robert A. Cell-based assays using calcein acetoxymethyl ester show variation in fluorescence with treatment conditions. Online. *Journal of Biological Methods*. 2015, roč. 2, č. 3. ISSN 2326-9901. Dostupné z: <https://doi.org/10.14440/jbm.2015.73>. [cit. 2024-10-03].
- [126] AMIRBEKYAN, Karen; DUCHEMIN, Nicolas; BENEDETTI, Erica; JOSEPH, Rinah; COLON, Aude et al. Design, Synthesis, and Binding Affinity Evaluation of Hoechst 33258 Derivatives for the Development of Sequence-Specific DNA-Based Asymmetric Catalysts. Online. *ACS Catalysis*. 2016, roč. 6, č. 5, s. 3096-3105. ISSN 2155-5435. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b00495>. [cit. 2024-10-03].

- [127] PICZON, Jessica a CHICO, K. Calcein AM Assay Standardization. Online. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/resources/application-notes/calcein-am-assay-standardization>. [cit. 2024-10-03].
- [128] ZHOU, Zijian; SONG, Jibin; NIE, Liming a CHEN, Xiaoyuan. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. Online. *Chemical Society Reviews*. 2016, roč. 45, č. 23, s. 6597-6626. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6CS00271D>. [cit. 2024-10-04].
- [129] SAI, Duc Loc; LEE, Jieun; NGUYEN, Duc Long a KIM, Young-Pil. Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. Online. 2021, roč. 53, č. 4, s. 495-504. ISSN 1226-3613. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00599-7>. [cit. 2024-10-04].
- [130] MURPHY, Michael P., Hülya BAYIR, Vsevolod BELOUSOV, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism* [online]. 2022, 4(6), 651-662 [cit. 2023-03-31]. ISSN 2522-5812. Dostupné z: [doi:10.1038/s42255-022-00591-z](https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z).
- [131] PALACIN-MARTINEZ, Cristina; ANEL-LOPEZ, Luis; ALVAREZ, Mercedes; NEILA-MONTERO, Marta; MONTES-GARRIDO, Rafael et al. The characterization of CellROX™ probes could be a crucial factor in ram sperm quality assessment. Online. *Frontiers in Veterinary Science*. 2024, roč. 11. ISSN 2297-1769. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1342808>. [cit. 2024-10-08].
- [132] CHOI, Heejun; YANG, Zhilin a WEISSHAAR, James C. Single-cell, real-time detection of oxidative stress induced in *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide CM15. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, roč. 112, č. 3. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1417703112>. [cit. 2024-10-08].
- [133] DI LULLO, Elizabeth a KRIEGSTEIN, Arnold R. The use of brain organoids to investigate neural development and disease. Online. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017, roč. 18, č. 10, s. 573-584. ISSN 1471-003X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.107>. [cit. 2024-10-08].
- [134] SAWAI, Tsutomu; SAKAGUCHI, Hideya; THOMAS, Elizabeth; TAKAHASHI, Jun a FUJITA, Misao. The Ethics of Cerebral Organoid Research: Being Conscious of Consciousness. Online. *Stem Cell Reports*. 2019, roč. 13, č. 3, s. 440-447. ISSN 22136711. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.003>. [cit. 2024-10-08].
- [135] XU, Can; YUAN, Xiaoye; HOU, Pengyu; LI, Ziru; WANG, Changsheng et al. Development of glioblastoma organoids and their applications in personalized therapy. Online. 2023, roč. 20, č. 5, s. 353-368. ISSN 20953941. Dostupné z: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0061>. [cit. 2024-10-08].
- [136] RYBIN, Matthew J.; IVAN, Michael E.; AYAD, Nagi G. a ZEIER, Zane. Organoid Models of Glioblastoma and Their Role in Drug Discovery. Online. *Frontiers in Cellular*

- Neuroscience. 2021, roč. 15. ISSN 1662-5102. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.605255>. [cit. 2024-10-08].
- [137] ALLEN, Marie; BJERKE, Mia; EDLUND, Hanna; NELANDER, Sven a WESTERMARK, Bengt. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. Online. Science Translational Medicine. 2016, roč. 8, č. 354. ISSN 1946-6234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6853>. [cit. 2024-11-22].
- [138] POON, Michael T. C.; BRUCE, Morgan; SIMPSON, Joanne E.; HANNAN, Cathal J. a BRENNAN, Paul M. Temozolomide sensitivity of malignant glioma cell lines – a systematic review assessing consistencies between in vitro studies. Online. BMC Cancer. 2021, roč. 21, č. 1. ISSN 1471-2407. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08972-5>. [cit. 2024-11-22].
- [139] WADMAN, Meredith. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. Online. Science. 2023, roč. 379, č. 6628, s. 127-128. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.adg6276>. [cit. 2025-03-02].
- [140] STUPP, Roger; GANDER, Marc; LEYVRAZ, Serge a NEWLANDS, Edward. Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. Online. The Lancet Oncology. 2001, roč. 2, č. 9, s. 552-560. ISSN 14702045. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00489-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00489-2). [cit. 2024-11-22].
- [141] MUTTER, Nicole a STUPP, Roger. Temozolomide: a milestone in neuro-oncology and beyond? Online. Expert Review of Anticancer Therapy. 2014, roč. 6, č. 8, s. 1187-1204. ISSN 1473-7140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1586/14737140.6.8.1187>. [cit. 2024-11-22].
- [142] GRANADA, Adrián E.; JIMÉNEZ, Alba; STEWART-ORNSTEIN, Jacob; BLÜTHGEN, Nils; REBER, Simone et al. The effects of proliferation status and cell cycle phase on the responses of single cells to chemotherapy. Online. Molecular Biology of the Cell. 2020, roč. 31, č. 8, s. 845-857. ISSN 1059-1524. Dostupné z: <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-09-0515>. [cit. 2024-11-27].
- [143] LEE, Sang Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. Online. 2016, roč. 3, č. 3, s. 198-210. ISSN 23523042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>. [cit. 2024-11-27].
- [144] PERAZZOLI, Gloria; PRADOS, Jose; ORTIZ, Raul; CABA, Octavio; CABEZA, Laura et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. Online. PLOS ONE. 2015, roč. 10, č. 10. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140131>. [cit. 2024-11-27].
- [145] SIRENKO, Oksana; MITLO, Trisha; HESLEY, Jayne; LUKE, Steve; OWENS, Windsor et al. High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures. Online. ASSAY and Drug Development Technologies. 2015,

- roč. 13, č. 7, s. 402-414. ISSN 1540-658X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/adt.2015.655>. [cit. 2024-12-16].
- [146] ACHILLI, Toni-Marie; MCCALLA, Stephanie; MEYER, Julia; TRIPATHI, Anubhav a MORGAN, Jeffrey R. Multilayer Spheroids To Quantify Drug Uptake and Diffusion in 3D. Online. *Molecular Pharmaceutics*. 2014, roč. 11, č. 7, s. 2071-2081. ISSN 1543-8384. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/mp500002y>. [cit. 2024-12-16].
- [147] PÉREZ-LÓPEZ, Alexandre; TORRES-SUÁREZ, Ana Isabel; MARTÍN-SABROSO, Cristina a APARICIO-BLANCO, Juan. An overview of in vitro 3D models of the blood-brain barrier as a tool to predict the in vivo permeability of nanomedicines. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2023, roč. 196. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114816>. [cit. 2024-11-14].
- [148] RAUT, Snehal; BHALERAO, Aditya; NOORANI, Behnam a CUCULLO, Luca. In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier. Online. *The Blood-Brain Barrier. Methods in Molecular Biology*. 2022, s. 25-49. ISBN 978-1-0716-2288-9. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2289-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2289-6_2). [cit. 2024-11-14].
- [149] HINKEL, S.; MATTERN, K.; DIETZEL, A.; REICHL, S. a MÜLLER-GOYMANN, C.C. Parametric investigation of static and dynamic cell culture conditions and their impact on hCMEC/D3 barrier properties. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019, roč. 566, s. 434-444. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.074>. [cit. 2024-11-14].
- [150] JAGTIANI, Ekta; YEOLEKAR, Mihika; NAIK, Shivraj a PATRAVALE, Vandana. In vitro blood brain barrier models: An overview. Online. *Journal of Controlled Release*. 2022, roč. 343, s. 13-30. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.011>. [cit. 2024-11-14].
- [151] VU, Kiem; WEKSLER, Babette; ROMERO, Ignacio; COURAUD, Pierre-Olivier a GELLI, Angie. Immortalized Human Brain Endothelial Cell Line HCMEC/D3 as a Model of the Blood-Brain Barrier Facilitates In Vitro Studies of Central Nervous System Infection by *Cryptococcus neoformans*. Online. *Eukaryotic Cell*. 2009, roč. 8, č. 11, s. 1803-1807. ISSN 1535-9778. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/EC.00240-09>. [cit. 2024-11-14].
- [152] HELMS, Hans C; ABBOTT, N Joan; BUREK, Malgorzata; CECHELLI, Romeo; COURAUD, Pierre-Olivier et al. In vitro models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. Online. 2016, roč. 36, č. 5, s. 862-890. ISSN 0271-678X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0271678X16630991>. [cit. 2024-11-14].
- [153] BROWN, Tyler D.; HABIBI, Nahal; WU, Debra; LAHANN, Joerg a MITRAGOTRI, Samir. Effect of Nanoparticle Composition, Size, Shape, and Stiffness on Penetration

- Across the Blood–Brain Barrier. Online. 2020, roč. 6, č. 9, s. 4916-4928. ISSN 2373-9878. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00743>. [cit. 2024-11-14].
- [154] JANJUA, Taskeen Iqbal; CAO, Yuxue; AHMED-COX, Aria; RAZA, Aun; MONIRUZZAMAN, Md et al. Efficient delivery of Temozolomide using ultrasmall large-pore silica nanoparticles for glioblastoma. Online. *Journal of Controlled Release*. 2023, roč. 357, s. 161-174. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.03.040>. [cit. 2024-11-14].
- [155] MINCHINTON, Andrew I. a TANNOCK, Ian F. Drug penetration in solid tumours. Online. *Nature Reviews Cancer*. 2006, roč. 6, č. 8, s. 583-592. ISSN 1474-175X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrc1893>. [cit. 2024-11-22].
- [156] ZHOU, Zijian; SONG, Jibin; NIE, Liming a CHEN, Xiaoyuan. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. Online. *Chemical Society Reviews*. 2016, roč. 45, č. 23, s. 6597-6626. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6CS00271D>. [cit. 2025-03-03].
- [157] YUE, Caixia; ZHANG, Chunlei; ALFRANCA, Gabriel; YANG, Yao; JIANG, Xinquan et al. Near-Infrared Light Triggered ROS-activated Theranostic Platform based on Ce6-CPT-UCNPs for Simultaneous Fluorescence Imaging and Chemo-Photodynamic Combined Therapy. Online. *Theranostics*. 2016, roč. 6, č. 4, s. 456-469. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/thno.14101>. [cit. 2025-03-03].
- [158] STUMMER, Walter; NOVOTNY, Alexander; STEPP, Herbert; GOETZ, Claudia; BISE, Karl et al. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. Online. *Journal of Neurosurgery*. 2000, roč. 93, č. 6, s. 1003-1013. ISSN 0022-3085. Dostupné z: <https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.6.1003>. [cit. 2025-03-04].
- [159] EATZ, Tiffany A.; EICHBERG, Daniel G.; LU, Victor M.; DI, Long; KOMOTAR, Ricardo J. et al. Intraoperative 5-ALA fluorescence-guided resection of high-grade glioma leads to greater extent of resection with better outcomes: a systematic review. Online. *Journal of Neuro-Oncology*. 2022, roč. 156, č. 2, s. 233-256. ISSN 0167-594X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11060-021-03901-9>. [cit. 2025-03-04].
- [160] QU, Shanqiang; XU, Rongyang; YI, Guozhong; LI, Zhiyong; ZHANG, Huayang et al. Patient-derived organoids in human cancer: a platform for fundamental research and precision medicine. Online. *Molecular Biomedicine*. 2024, roč. 5, č. 1. ISSN 2662-8651. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43556-023-00165-9>. [cit. 2025-03-11].
- [161] JUNG, Erik; OSSWALD, Matthias; RATLIFF, Miriam; DOGAN, Helin; XIE, Ruifan et al. Tumor cell plasticity, heterogeneity, and resistance in crucial microenvironmental niches in glioma. Online. *Nature Communications*. 2021, roč. 12, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21117-3>. [cit. 2025-03-11].

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma procentuálního zastoupení a lokalizace glioblastomu v mozku. Převzato a upraveno z [16].

Obrázek 2: Grafický přehled standardních a nových terapeutických přístupů glioblastomu. Převzato a upraveno z [22], [32], [33].

Obrázek 3: Různé možnosti podání léčiv pacientovi při terapii glioblastomu. Převzato a upraveno z [42].

Obrázek 4: Znázornění zdravé a porušené BBB glioblastomu. Převzato a upraveno z [36].

Obrázek 5: Schematické znázornění základních složek mikroprostředí glioblastomu. Převzato a upraveno z [47], [51], [52].

Obrázek 6: Schématické znázornění různých typů 2D kultivačních systémů. Převzato a upraveno z [56].

Obrázek 7: Přehled využívaných 3D modemu. Převzato a upraveno z [56].

Obrázek 8: Zvířecí in vivo modely glioblastomu. Převzato a upraveno z [63].

Obrázek 9: Struktury testovaných látek.

Obrázek 10: Proces kryokonzervace buněk. Převzato a upraveno z [81].

Obrázek 11: Porovnání 2D a 3D kultivace. Převzato a upraveno z [86].

Obrázek 12: Porovnání dvou nejčastějších 3D buněčných modelů. Převzato a upraveno z [87].

Obrázek 13: Postup tvorby sféroиду. Převzato a upraveno z [91].

Obrázek 14: Princip testu SRB. Převzato a upraveno z [100].

Obrázek 15: Princip testu CellTiterGlo-3D. Převzato a upraveno z [103].

Obrázek 16: Schéma hematoencefalické bariéry. Převzato a upraveno z [108].

Obrázek 17: Schématické znázornění analýzy TEER. Převzato a upraveno z [111].

Obrázek 18: Schéma kokultivačního modelu BBB složeného z buněk hCMEC/D3 umístěných v apikálních částí a buněk U87MG v bazolaterální části systému. Převzato a upraveno z [115].

Obrázek 19: Schéma postupu měření distribuce aplikovaných komplexů pomocí konfokálního mikroskopu.

Obrázek 20: Schéma morfologických změn 3D nádorových sféroidech v reakci na cytotoxicitu/antiproliferativní aktivitu vyvolanou léčivem. Převzato a upraveno z [121].

Obrázek 21: 3D schéma navázání barviva Hoechst do DNA struktury. Převzato a upraveno z [122].

Obrázek 22: Princip analýzy metabolické aktivity pomocí sondy Kalcein AM. Převzato a upraveno z [127].

Obrázek 23: Princip fotodynamické terapie. Převzato a upraveno z [129].

Obrázek 24: Schéma postupu implantace sféroidu do organoidu.

Obrázek 25: Analýza středních průměrů sféroidů glioblastomu U87MG ošetřených iridiovými komplexy Ir1 – Ir10 a temozolomidem (TMZ).

Obrázek 26: Analýza morfologie sféroidů glioblastomu U87MG ošetřených iridiovými komplexy Ir1 – Ir10 a temozolomidem (TMZ).

Obrázek 27: Schéma postupu stanovení metabolické aktivity ošetřených buněk sféroidů.

Obrázek 28: Analýza sféroidů ošetřených komplexy Ir3 (panely 1, 2\*), Ir4 (panely 3, 4\*) a Ir5 (panely 5, 6\*) obarvených barvivem Hoechst 33258 (A), kalceinem AM (B), propidium

jodidem (C) a přeložení všech kanálů (D) pomocí konfokálního mikroskopu. Měřítko představuje 200  $\mu\text{m}$ .

Obrázek 29: Kvantifikace poměru intenzity fluorescence Kalceinu AM k PI stanovené pro jednotlivé experimentální skupiny.

Obrázek 30: Distribuce zkoumaných komplexů Ir3 (panel 1), Ir4 (panel 2) a Ir5 (panel 3) ve sféroidech glioblastomu U87MG analyzována konfokální mikroskopií, kdy pane A odpovídá celkové projekci fluorescence aplikovaných látek, panely B, C a D představují pouze vybrané vrstvy sferoиду (střední, mírně vyšší a horní část) a panel E ukazuje 3D povrchový graf projekce maximální intenzity fluorescence. Měřítko představuje 300  $\mu\text{m}$ .

Obrázek 31: Monitorování integrity a propustnosti buněčné bariéry po aplikaci studovaných komplexů v reálném čase.

Obrázek 32: Detekce ROS ve sféroidech glioblastomu U87MG před a po ozáření vzorků modrým světlem (420 nm, 1mW, 60 s) obarvených sondou CellRox® (panel A), PI (panel B) a překrytí obou kanálů (panel C). Obrázky reprezentují projekci 10 vrstev. Měřítko snímků je 300  $\mu\text{m}$ .

Obrázek 33: Kvantifikace průměrné intenzity fluorescence CellRox® a PI ve sféroidech U87MG ozářených modrým laserovým světlem.

Obrázek 34: Snímky fúzních modelů pořízené pomocí konfokálního mikroskopu (panel A), které vizualizují fluorescenční signál emitovaný testovanou sloučeninou Ir4, a optického mikroskopu, který poskytuje pohled na strukturální charakteristiky modelového systému. Měřítko představuje 200  $\mu\text{m}$ .

Obrázek 35: Analýza účinnosti aplikované léčby využívající kombinaci komplexu Ir4 se selektivním ozáření sferoиду modrým laserovým světlem (panely 1) v porovnání s neošetřenou kontrolou (panely 2) hodnocena ve stanoveném časovém intervalu (120 hodin) od zákroku. Měřítko představuje 200  $\mu\text{m}$ .

Obrázek 36: Analýza účinnosti aplikované léčby na růst a migraci buněk U87MG-RFP do cerebrálního organoidu zobrazená pomocí fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční kanál-vizualizace buněk U87MG-RFP (panely A), překryvu světlého pole s fluorescenčním kanálem (panely B) a porovnáním časově závislé změny oblasti výskytu buněk U87MG (panely  $\Delta$ ). Měřítko představuje 500  $\mu\text{m}$ .

## 9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Antiproliferativní aktivita zkoumaných sloučenin stanovená ve 2D a 3D modelech vytvořených z U87MG buněk.

Tabulka 2: Koefficienty permeability měřené pro model BBB vytvořený z buněk hCMEC/D3.

Tabulka 3: Naakumulované množství iridia stanovené ve využitých buněčných liniích ko-kultivačního BBB modelu.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

3D-CRT	3D-konformní radioterapie
5-ALA	kyselina 5-aminolevulová
ATCC	Americká sbírka tkáňových kultur
ATP	adenosintrifosfát
BBB	hematoencefalická bariéra
BMEC	mozkové mikro-vaskulární endotelové buňky
BSA	hovězí sérový albumin
CNS	centrální nervový systém
CT	počítačová tomografie
Da	jednotka Dalton
DMEM	kultivační médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPBS	fosfátový pufr (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
EB	embryoidní tělíska
ECACC	Evropská sbírka ověřených buněčných kultur
ECIS	monitorovací systém (Electric Cell-substrate impedance sensing)
ECM	extracelulární matrice
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor
FAAS	plamenový atomový absorpční spektrometr
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA
FGF2	fibroblastový růstový faktor
FI	index fototoxicity
GA-1000	směs gentamicinu a amfotericinu

GEMM	geneticky upravené myši
Gy	jednotka Gray
hiPSC	lidské indukované pluripotentní kmenové buňky
IC <sub>50</sub>	polovina maximální inhibiční koncentrace
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IDH1	gen enzymu isocitrátdehydrogenasa 1
IMRT	radioterapie s modulovanou intenzitou svazku
MGMT	protein methylguaninmethyltransferáza
MQ voda	deionizovaná voda v čistotě Milli-Q z přístrojů firmy Millipore
MRI	skenovací magnetickou rezonancí
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
Papp	koeficient permeability
PBT	terapie protonovým paprskem
PBS	fosfátový pufr
PDT	fotodynamická terapie
PDX	xenoimplantáty odvozené od pacienta
pH	potenciál vodíku
PI	propidium jodid
R3-IGF-1	rekombinantní růstový faktor lidského inzulínu
RFP	červený fluorescenční protein
ROI	ručně vymezená oblast zájmu
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie s reversní fází
SRB	sulforhodamin B (2-(3-diethylamino-6-diethylazaniumylidene-xanthen-9-yl)-5-sulfo-benzenesulfonate)
TCA	kyselina trichloroctová
TEER	transepiteliální/transendoteliální elektrický odpor

TME	nádorové mikroprostředí
TMI	index nádorové hmoty
TMZ	Temozolomid
ULA	nízko-adhezivní povrch
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VMAT	volumetricky (objemově) modulovaná oblouková terapie
WHO	Světová zdravotnická organizace