

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Frederika Lenčářová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza patientských vzoriek v rámci
personalizovanej medicíny**

Bakalářská práce

Frederika Lenčěšová

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Frederika LENČEŠOVÁ**
Osobní číslo: **R18651**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Analýza patientských vzoriek v rámci personalizované medicíny**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Literárna rešerš študovanej témy
2. Kultivácia bunkových línii a imunofluorescencia
3. Disociácia tkanív a kultivácia organoidov
4. Analýza organoidov a tkanív pomocou imunohistochemie
5. Optimalizácia opakovaného farbenia rovnakých preparátov, predovšetkým tkanivových

Rozsah pracovnej zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tisková**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

1. Mark N. Stein, Thomas L. Jang: Striving Toward a Cure for Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, June 20, 2016, DOI: 10.1200/JCO.2015.66.3146;
2. Jia-Ren Lin, Benjamin Izar, Shu Wang, Clarence Yapp, Shaolin Mei, Parin M Shah, Sandro Santagata, Peter K Sorger: Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *eLife*, July 11, 2018 DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.31657>
3. Jarno Drost, Wouter R. Karthaus, Dong Gao, Else Driehuis, Charles L. Sawyers, Yu Chen, Hans Clevers: Organoid culture systems for prostate epithelial and prostate cancer tissue. *Nature Protocol*, 2016 February ; 11(2):doi:10.1038/nprot.2016.006
4. Ayesha A. Shafi et al: Patient-derived Models Reveal Impact of the Tumor Microenvironment on Therapeutic Response. *European Urology Oncology*, September 2018 <https://doi.org/10.1016/j.euo.2018.04.019>
5. Douglas Hanahan, Robert A. Weinberg: Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 2011 DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

Ústav klinické a molekulární patologie

Datum zadání bakalářské práce: 21. dubna 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry



V Olomouci dne 21. dubna 2020

SÚHRN

Meno a priezvisko autora:	Frederika Lenčేశová
Názov práce:	Analýza patientských vzoriek v rámci personalizovanej medicíny
Typ práce:	Bakalárska
Pracovisko:	Ústav klinické a molekulární patologie LF UP
Vedúci práce:	doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2021
Abstrakt:	<p>Personalizovaná medicína sa zameriava na optimalizáciu liečby podľa vlastností jednotlivých pacientov. Bakalárska práca sa zaoberá kultiváciou nádorových buniek odvodených od kolorektálneho karcinómu v 2D a 3D podmienkách a porovnaní vplyvu chemoterapeutík na tieto kultivačné modely. V práci sme rovnako vykonali kultiváciu organoidov odvodených od pacientov. Použitím imunohistochemickej analýzy sme porovnávali zachovanie vlastností primárneho tkaniva sledovaním CK20 a CDX2 proteínov v 3D modeloch. Výsledky našich experimentov potvrdili rozdiel medzi 2D a 3D kultivačnými modelmi a možnosť využitia kultivácie patientských organoidov pre personalizovanú medicínu.</p>
Kľúčové slová:	kolorektálny karcinóm, 2D a 3D kultivačné modely, sféroidy a organoidy.
Počet strán:	59
Počet príloh:	0
Jazyk:	Slovenský

SUMMARY

Author's first name and Suriname:	Frederika Lenčėšová
Title of thesis:	Analysis of patient samples in personalized medicine
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Clinical and Molecular Pathology LF UP
Supervisor:	doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.
The year of presentation:	2021
Abstract:	Personalized medicine focuses on tailoring treatment according to the individual characteristics of patients. The bachelor thesis deals with cultivation of cells derived from colorectal cancer in 2D and 3D conditions and comparing the effect of chemoterapeutics on these culture models. In this work we have also established organoids derived from patient samples. Using immunohistochemical analysis, we have compared the preservation of specific tissue properties by monitoring CK20 and CDX2 proteins in 3D models. The results of our experiments confirmed the difference between 2D and 3D culture models and proved feasibility of patient-derived organoids in personalised medicine.
Keywords:	colorectal cancer, 2D and 3D culture models, spheroids, organoids.
Number of pages:	59
Number of appendices:	0
Language:	Slovak

PREHLÁSENIE

Čestne prehlasujem, že túto bakalársku prácu som vypracovala samostatne pod vedením pána doc. Mgr. Jana Bouchala, Ph.D. s použitím literatúry uvedenej v zozname literatúry.

V Olomouci dňa 5. 5. 2021

.....

Podpis

POĎAKOVANIE

Touto cestou by som sa rada poĎakovala pánovi doc. Mgr. Janovi Bouchalovi, Ph.D. za odborné vedenie tejto práce, láskavý prístup a trpezlivosť. Ďalej by som sa chcela poĎakovať pani Mgr. Monike Levkovej za pomoc pri práci s organoidmi, pani Pimrovej za zaučenie pri práci s bunkami a v neposlednom rade pani Mgr. Kateřine Čížkovej, Ph.D. za poskytnutie bunkovej línie HT-29.

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	CIELE PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1	Personalizovaná medicína.....	3
3.1.1	Imunohistochemická analýza.....	4
3.1.2	Multiplexná imunohistochemická analýza	6
3.2	Kolorektálny karcinóm	8
3.2.1	Molekulárny princíp vzniku CRC.....	8
3.2.3	Liečba CRC.....	10
3.3	<i>In vitro</i> kultivačné modely.....	12
3.3.1	Charakteristika trojrozmerných (3D) bunkových kultúr	14
3.3.3	Organoidy odvodené od nádorov.....	17
4	MATERIÁL A METÓDY	19
4.1	Biologický materiál.....	19
4.2	Použité chemikálie, súpravy a roztoky.....	19
4.3	Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	21
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	22
4.4.1	Pasážovanie buniek.....	22
4.4.2	Ovplyvnenie buniek cytotoxickými látkami.....	22
4.4.3	Kultivácia multicelulárnych sféroidov v „low-attachment“ nádobách.....	22
4.4.4	Kultivácia multicelulárnych sféroidov v jamkách s 1,5% agarózou a ich ovplyvnenie cytotoxickými látkami.....	22
4.4.5	Disociácia tkanív.....	23
4.4.6	Pasážovanie organoidov	24
4.4.7	Vytváranie trombínových zrazením a ich fixácia vo formalíne	24
4.4.8	Imunohistochemické farbenie parafínom fixovaných rezov tkaniva.....	24

5.	VÝSLEDKY	26
5.1	Vyhodnotenie viability buniek v 2D kultúre po ovplyvnení cytotoxickými látkami	26
5.2	Hodnotenie cytotoxicity na multiceulárne sféroidy	28
5.3	Formalínová fixácia sféroidov a zaliatie do parafinu pre imunohistochemickú analýzu	30
5.4	Imunohistochemická analýza organoidov a tkanív	32
6	DISKUSIA.....	35
7	ZÁVER	38
8	LITERATÚRA	40

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

2D	dvojdimezionálne
3D	trojdimezionálne
5-FU	5-fluorouracil
AEC	amino-9-etylkarbazol
APC	adenomatózny polypózny gén
aSCs	orgánovo špecifické dospelé kmeňové bunky
CDX2	gén homeoboxu kaudálneho typu 2
CK 20	cytokeratín 20
CRC	kolorektálny karcinóm
DAB	3,3'-diaminobenzidín-tetrahydrochlorid
ddH ₂ O	deionizovaná voda
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
ECM	extracelulárna matrix
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
EGFR	receptor epidermiálneho rastového faktoru
ES	pluripotentné embryotické bunky
FBS	fetálne bovinné sérum
FOLFIRI	FOL-folínová kyselina, F-5-fluorouracil, IRI-irinotekan
FOLFOX	FOL-folínová kyselina, F-5-fluorouracil, OX-oxaliplatina
iPS	indukované pluripotentné bunky
MAPK	mitogénom aktivované proteínkinázy
MMR	gény na opravu nesúladu DNA (DNA mismatch repair)

MTT	3-[4,5-dimetylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
MSI	mikrosatelitová nestabilita
NGS	sekvenovanie novej generácie (next generation sequencing)
TGFR- β	receptor transformujúceho rastového faktoru
TP53	tumorový proteín p53
PBS	fosfátom pufovaný soľný roztok
PD1	proteín programovanej smrti 1
PD-L1	programovaný ligand smrti 1
PI3K	fosfoinozitol-3-kinázy
SATB2	špeciálny AT viažuci proteín 2
SDS	dodecylsulfát sodný

ZOZNAM OBRÁZKOV A TABULIEK

Obr. č. 1: Schéma mutagenézy CRC.

Obr. č. 2: Schématická ilustrácia rozdielov medzi 2D a 3D bunkovými kultúrami.

Obr. č. 3: Kultivačné techniky využívané k vytváraniu 3D modelov.

Obr. č. 4: Odvodenie organoidov z primárneho kolónového tkaniva a tumorového kolónového tkaniva.

Obr. č. 5: Hodnotenie viability HT-29 buniek v 2D kultúre metódou MTT testu, za pôsobenia zmesi cytotoxických látok 5-fluorouracilu a oxaliplatiny.

Obr. č. 6: Hodnotenie viability HT-29 buniek v 2D kultúre metódou MTT testu, za pôsobenia cytotoxickej látky oxaliplatiny.

Obr. č. 7: Hodnotenie viability HT-29 buniek v 2D kultúre metódou MTT testu, za pôsobenia cytotoxickej látky 5-fluorouracilu.

Obr. č. 8: Vplyv cytotoxických látok na multielulárne sféroidy.

Obr. č. 9: Hodnotenie zmeny veľkosti multielulárnych sféroidov bunkovej línie HT-29 vplyvom cytotoxických látok 5-fluorouracilu, oxaliplatiny a ich zmesou.

Obr. č. 10: Pomôcky pre kultiváciu 3D modelov a ich zaliatie do parafínu

Obr. č. 11: Hematoxylínom vizualizované multielulárne sféroidy, ktoré boli prenesené na terčik tromi spôsobmi.

Obr. č. 12: Imunohistochemická analýza parafínom fixovaných rezov sféroidov farbených protilátkami CK20 a CDX2.

Obr. č. 13: Organoidy odvodené od pacientov kultivované v matrigéli.

Obr. č. 14: Imunohistochemická analýza formalín-fixovaných rezov tkanív a organoidov.

Tab. č. 1. Príprava CRC média.

1 ÚVOD

Personalizovaná medicína si kladie za úlohu optimalizovať liečbu jednotlivým potrebám pacienta. V rámci prispôsobenia liečby a monitoringu možného progresu ochorenia personalizovaná medicína využíva okrem techník molekulovej biológie i konvenčné techniky imunohistochemie. Pre neustáli pokrok vo vývoji liečiv sa využívajú rôzne techniky kultivácie buniek. V súčasnej dobe je venovaná pozornosť 3D kultivačným technikám, kde môžeme zaradiť kultiváciu multielulárnych sféroidov a organoidov. Organoidy sú 3D modely, vyvíjajúce sa z kmeňových buniek pochádzajúcich od pacientov v prostredí extracelulárnej matrix (napr. Matrigél). Zatiaľ čo multielulárne sféroidy môžeme charakterizovať ako 3D modely vyvíjajúce sa z imortalizovaných bunkových línií v suspenznej kultúre v kultivačných nádobách s upraveným nízkoadhezným povrchom. Táto práca sa s využitím 2D a 3D kultivačných modelov venuje problematike kolorektálneho karcinómu. Bližšie sme porovnávali cytotoxický vplyv chemoterapeutík bežne používaných pri liečbe kolorektálneho karcinómu na 2D a 3D bunkové modely. Použitím imunohistochemických farbiacich techník sme porovnávali expresiu špecifických biomarkerov vyskytujúcich sa v kolorektálnych nádoroch, čím sme posudzovali zachovanie vlastností primárneho tkaniva v 3D bunkových kultúrach.

2 CIELE PRÁCE

1. Literárna rešerš študovanej témy.
2. Kultivácia bunkových línií.
3. Disociácia tkanív a kultivácia organoidov.
4. Analýza organoidov a tkanív pomocou imunohistochemie.

3 LITERÁRNY PREHLAD

3.1 Personalizovaná medicína

Personalizovaná medicína alebo taktiež často označovaná ako presná medicína znamená prispôbenie terapie individuálnym vlastnostiam každého pacienta (Wang a kol., 2016). Rozvíjajúca sa oblasť personalizovanej medicíny zohráva dôležitú úlohu v prevencii, diagnostike, prognóze rakoviny a predovšetkým v jej terapii (Jackson a Chester, 2014). Štandardná liečba rakoviny zahŕňa: chirurgický zákrok, radiačnú terapiu a chemoterapiu (Krzyszczuk a kol., 2018). Avšak použitie konvenčnej chemoterapie je vysoko nešpecifické v zameraní liečiva priamo na rakovinové bunky, vďaka čomu sa stávajú zdravé bunky zraniteľné voči nežiaducím účinkom liečiva. Taktiež používaním chemoterapie môže dôjsť k strate účinnosti a vzniku chemorezistencie (Prabhu a kol., 2015; Wang a kol., 2016). Ďalej z dôvodu heterogenity rakoviny sú štandardné spôsoby liečby, ako chemoterapia alebo ožarovanie účinné iba u skupiny pacientov. Nádory môžu mať rôzne genetické príčiny a môžu exprimovať rôzne proteíny v porovnaní jedného pacienta s druhým. Použitie personalizovanej medicíny zahŕňa stanovenie genetickej predispozície choroby, identifikáciu jednotlivých skupín pacientov pre klinické skúšky a identifikáciu pacientov, u ktorých je vyššia pravdepodobnosť, že budú dobre reagovať na špecifickú terapiu (Krzyszczuk a kol., 2018). Personalizovaná medicína využíva diagnostické testy ako sú molekulárne metódy, ktoré umožňujú testovanie génových variácií, expresiu génov, proteíny, metabolity ako aj vznik nových spôsobov liečby zameraných na molekulové mechanizmy. Genetické testovanie môžeme kategorizovať ako (1) diagnostické: vyhodnotenie genetických sekvencií môže potvrdiť prítomnosť ochorenia, pričom sa často využíva na onkologické sledovanie, (2) prognostické: sledovanie expresie vybraných markerov alebo určenie genetických mutácií s možnou náchylnosťou zhoršenia zdravotného stavu, (3) prediktívne, ktoré hodnotia genetické variácie s cieľom identifikovať pacientov, u ktorých je pravdepodobnosť, že budú reagovať na konkrétnu terapiu (Hoggatt, 2011). Konvenčné techniky molekulovej biológie čoraz viac nahrádzajú technológie sekvenovania novej generácie (NGS). Pretože aj napriek vysokej citlivosti a špecifickosti pri detekcii mutácií sa konvenčné techniky nezaobídu bez vopred špecifikovaných biomarkerov. NGS technológie ako Illumina, SOLiD, nanopórové sekvenovanie či SMRT umožňujú simultálnu analýzu širokého spektra genomických zmien, vrátane mutácií, variácií a translokácií vo viacerých génoch. Preto poskytujú účinnejšiu analýzu tkanív v porovnaní so sériovými analýzami

jednotlivých biomarkerov, najmä v kontexte genómovej zložitosti nádorov (Krzyszczyk a kol., 2018; Malone a kol., 2020). Medzi bežné konvenčné diagnostické metódy personalizovanej medicíny patrí imunohistochemia a fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH). FISH predstavuje techniku pre stanovenie preusporiadania DNA a tiež je bežne používaná pre potvrdenie amplifikácií na génovej úrovni (Malone a kol., 2020). FISH sa používa napríklad na kvantifikáciu expresie génu HER2 pri nádoroch prsníka. Pacienti s nadmernou expresiou HER2 génu majú priaznivú reakciu na liečbu trastuzumabom (Hoggatt, 2011). Imunohistochemická analýza dokáže zistiť zmeny na proteínovej úrovni, ktorá môže vyplývať z génových aberácií, alebo zo špecifických DNA mutácií.

3.1.1 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemická analýza sa používa na detekciu bunkových alebo tkanivových, na ktoré sa viažu špecifické protilátky (Matos a kol., 2010). Vyhodnotenie biomarkerov poskytuje dôležité prognostické a prediktívne informácie, rovnako môže byť v súlade s konkrétnymi možnosťami liečby pre jednotlivca (McCourt a kol. 2013).

Biomarker je molekula, ktorú je možné detegovať vo vzorkách tkaniva, krvi alebo stolici a umožňujú tak identifikáciu patologických stavov, ako je rakovina. Koncentrácia nádorových markerov testovaných v ranom štádiu ochorenia pomáhajú včasnej diagnostike a používajú sa pri skriningových testoch. Niektoré biomarkery sa považujú za dôležité pri monitorovaní ochorenia, účinnosti neoadjuvantnej liečby, chirurgického zákroku, adjuvantnej chemoterapie a rádioterapie i následného sledovania možnej recidívy (Lech a kol., 2016). Najpoužívanejšie imunohistochemické tkanivové markery pre kolorektálny karcinóm sú cytokeratíny CK20, CK7 a proteín CDX2. Najbežnejším imunofenotypom CRC je pozitivita na CK20 a negativita na CK7. Avšak až 20% nádorov môže vykazovať CK7+/CK20- alebo CK7-/CK20- vzory farbenia. Znížená alebo chýbajúca expresia CK20 v CRC môže byť spojená vysokou mikrosatelitovou nestabilitou (Fleming a kol., 2012). CDX2 je gén homeoboxu kaudálneho typu 2, ktorý kóduje transkripčný faktor dôležitý pre proliferáciu a diferenciáciu buniek črevného epitelu. Vysoké hladiny CDX2 sú typické pre CRC, avšak jeho expresia nemusí korelovať s tumorovým stupňom a úrovňou diferenciácie. Mnoho štúdií zistilo, že CDX2 je exprimovaný aj v iných adenokarcinómoch gastrointestinálneho traktu, ako je napr. adenokarcinóm žalúdka. Samotná expresia CDX2 nemôže úplne rozlíšiť medzi adenokarcinómami, preto je veľmi užitočné, ak sa používa ako doplnok k farbeniu cytokeratínov (Werling a kol., 2003; Oh a Joo, 2020). Ďalší tkanivový marker pre CRC

je napr. špeciálny AT viažuci proteín 2 (SATB2), jeho zvýšená expresia poukazuje na metastazovanie CRC (Lin a kol., 2014).

Proces imunohistochemického farbenia pozostáva prvotne so spracovania vzoriek tkaniva. Na fixáciu tkaniva sa aplikujú dva typy fixačných látok: (1) nekoagulačné fixačné látky ako formaldehyd, glutaraldehyd alebo kyselina octová (2) koagulačné fixačné látky ako alkohol, zinková soľ alebo oxid chromičitý. Často aplikovaná fixačná látka v histopatológii je 10% neutrálne pufrovaný formalín (O'Hurley a kol., 2014). Takto fixované tkanivo v parafíne sa nakrája na tenké pláty s hrúbkou 3 – 4 μm a tie sú vložené na podložné sklíčko. Na odhalenie antigénov, ktoré boli zmenené fixáciou, možno použiť enzymatické natrávenie vplyvom trypsínu alebo proteázami. Obmedzene sa enzymatické odhalenie používa pri antigénoch ako cytokeratíny alebo imunoglobulíny. Najčastejšie sa na odhalenie antigénov používa zahrievanie tkanivových rezov (Schacht a Kern 2015, Kim a kol., 2016). Spravidla sa na zahrievanie využívajú autoklávy alebo mikrovlnné rúry pri teplote 120 °C, plnom tlaku, 750 – 800 W a po dobu 10 minút. Po odhalení antigénu nasleduje blokovanie proteínov, aby sa znížilo pozadie reakcie na zamedzenie nešpecifických väzieb primárnych alebo sekundárnych protilátok (Kim a kol., 2016). Po vyblokovaní proteínov nasleduje interakcia s protilátkou. Výber vhodnej primárnej protilátky je zásadný pre správne označenie požadovaného biomarkeru. Často sú preferované monoklonálne protilátky kvôli ich vyššej špecifickosti a reprodukovateľnosti, pretože sa viažu na jeden cieľový antigén (Taube a kol. 2020). Detekčné systémy v imunohistochemii možno kategorizovať ako priame alebo nepriame. Pri priamej detekcii je primárna protilátka značená enzymaticky alebo fluorofórmami, čo umožňuje detegovať antigén priamo na tkanivových rezoch bez použitia sekundárnych protilátok. Táto metóda detekcia je časovo nenáročná, ale jej nevýhodou je nižšia citlivosť v porovnaní s nepriamou detekciou. Tá zahŕňa použitie značených sekundárnych protilátok, ktoré sa špecificky viažu na primárne protilátky (O'Hurley a kol. 2014). Značkovacie techniky zahŕňajú fluorescenčné zlúčeniny alebo aktívne enzýmy (Schacht a Kern, 2015). Sekundárna protilátka značená enzymaticky je detekovaná prostredníctvom reakcie enzýmu s chromogénnymi substrátmi, čím sa získa silne zafarbený produkt. Medzi najpoužívanejšie enzýmy sa radí alkalická fosfatáza a chrenová peroxidáza (O'Hurley a kol. 2014). Najčastejšie používané peroxidázové substráty sú 3,3'-diaminobenzidín-tetrahydrochlorid (DAB) amino-9-etylkarbazol (AEC), ktoré sú konvertované na hnedý a červený pigment. Pokrok v technikách imunohistochemie

smeroval aj k vývoji multiplexných farbení, ktoré umožňujú detailnejšiu charakterizáciu tkanív (Sukswai a Khoury, 2019).

3.1.2 Multiplexná imunohistochemická analýza

Metódy multiplexného imunohistochemického farbenia možno všeobecne definovať ako technológie používané na identifikáciu prítomnosti viacerých biologických markerov v jednej vzorke tkaniva. Metódy farbenia sú kategorizované ako simultálne alebo sekvenčné. V simultánných imunohistochemických farbeniach sa používa viac protilátok na označenie viacerých antigénov počas jedného procesu farbenia. Naopak sekvenčné imunohistochemické farbenia zahŕňajú niekoľko iterácií značenia jednotlivých antigénov, každá s inak označenou sekundárnou protilátkou, pokiaľ nie sú vizualizované všetky požadované antigény (Dixon a kol., 2015). Multiplexné farbenia môžu byť vizualizované vo svetlom poli alebo v tmavom poli (pomocou fluorescencie). Na vizualizáciu v mikroskope svetlého poľa sa používa chromogénna depozícia rôznych párov chromogén-enzým. Chromogény sú vizualizované reakciou buď s chrenovou peroxidázou alebo alkalickou fosfatázou. Vizualizáciu je možné vylepšiť pridaním kontrastných látok ako je napr. metylová zeleň alebo hematoxylín, ktoré farbja jadrá zelenou alebo modrou farbou (Stack a kol. 2014). Pred každým imunofarbiacim cyklom je potrebné odizolovanie chromogénu použitím chemického odfarbenia a opätovne odhaliť antigén (Taube a kol. 2020). Nevýhodou chromogénneho multiplexného farbenia je možný vznik krížovej reaktivity pri konjugácii s chrenovou peroxidázou alebo alkalickou fosfatázou. Krížovej reaktivity možno predísť stratégiou postupného farbenia. Ďalšou nevýhodou je možnosť prekrytia jednej farby druhou (ich chromogénnych spektier), čo značne obmedzuje multiplexné značenie v jasnom poli (Stack a kol. 2014).

Fluorescencné multiplexné farbenie umožňuje vizualizáciu farbeného tkaniva v tmavom poli (Stack a kol., 2014). Základným princípom tejto metódy je, že každý cieľový proteín môže byť zafarbený špecifickými protilátkami označenými odlišnými fluoroformi. Po excitácii fluorofory emitujú pri charakteristickej vlnovej dĺžke a na zber signálu sa používa mikroskop so špecifickými súpravami pásmových filtrov (Taube a kol., 2020). Na zníženie autofluorescencie a nešpecifických väzieb sa aplikuje cyklus predfarbenia, kedy sa vzorky inkubujú so sekundárnymi protilátkami značenými fluoroformi. Nasleduje oxidácia fluoroforov v roztoku peroxidu vodíka s vysokým pH v prítomnosti svetla tzv. bielenie fluoroformi (Lin a kol., 2018). Primárne protilátky môžu byť priamo konjugované s fluoroformi alebo nepriamo, kedy sú s fluoroformi

konjugované sekundárne protilátky. Nepriame značenie môže byť výhodné pre amplifikáciu signálu aplikovaním viacerých sekundárných protilátok (Stack a kol. 2014). Ďalšia možnosť amplifikácie multiplexného farbenia je nepriame značenie prostredníctvom tyramidu. Ten zaistuje zosilnenie signálu cez polyméry chrovej peroxidázy, detekcia je spojená s aktiváciou tyramidových fluoroforov. Aktivovaný tyramid sa viaže na tyrozínové zvyšky do cieľového epitopu, teplom sa odstráni nekovalentne viazaná primárna protilátka a fluorofor naviazaný na tyramid zostane uložený na tkanive. Cykly farbenia a amplifikácie je možné opakovať pokiaľ nie sú označené všetky požadované ciele. Výhodou tejto techniky je možnosť použitia protilátok produkovaných rovnakým druhom (Taube a kol. 2020). Na zobrazenie multiplexných farbení sa využívajú zobrazovacie počítačové technológie, ktoré sprístupňujú informácie v klinickej praxi a zlepšujú prognostické a prediktívne zaradenie pacientov. Jedná sa o automatizované systémy digitálnej patológie ako napr. HALO (Indica Labs), Vectra/inForm (Perkin Elmer / Akoya Biosciences) alebo SlidePath (Leica biosystems). Multiplexné techniky umožňujú získanie kvantitatívnych informácií o odlišných podtypoch imunitných buniek infiltrujúcich nádor v rámci zachovanej tkanivovej architektúry, čo umožňuje analýzu topológie a blízkosť medzi špecifickými populáciami buniek. V konečnom dôsledku kvantitatívne priestorové profilovanie kľúčových nádorovo-imunitných dráh môže zlepšiť rozvrstvenie onkologických pacientov pre imunoterapiu. Napríklad expresia PD-L1 sa našla vo frakcii buniek CD3+ aj CD3- takmer vo všetkých druhoch rakoviny naproti tomu expresia PD-L1 na nádorových bunkách bola viditeľná iba u menšiny typov nádorov. To ukazuje potrebu analýzy imunitného kontrolného bodu multiplexným farbením u jednotlivých pacientov (Hofman a kol. 2019). Jedným z mechanizmov, pomocou ktorých zostávajú rakovinové bunky skryté pred imunitným systémom je regulácia PD-1/PD-L1 interakcie (Piawah a Venook 2019). Imunoterapeutické látky ako nivolumab a pembrolizumab sa zameriavajú na štruktúry PD-1 na CD8 pozitívnych T lymfocytoch, zatiaľ čo atezolizumab, avelumab a durvalumab sa zameriavajú na PD-L1 na nádoroch. Blokovanie interakcií PD-1/PD-L1 obnovuje protirakovinovú imunitu a podporuje usmrcovanie rakovinových buniek sprostredkované T lymfocytmi (Wrobel a Ahmed, 2019).

3.2 Kolorektálny karcinóm

Kolorektálny karcinóm (CRC) je tretou najčastejšie diagnostikovanou formou rakoviny celosvetovo, tvorí 11% všetkých diagnóz rakoviny. CRC je druhou najsmrteľnejšou rakovinou na svete, odhadom tvorí asi 881 000 úmrtí za rok (referencia pre rok 2018). Karcinogenéza je započatá nadmernou proliferáciou buniek slizničného epitelu hrubého čreva. Tieto výrastky sú známe ako polypy a môžu rásť postupne 10-20 rokov, kým sa stanú rakovinovými. Najbežnejšou formou sú adenómy alebo polypy, ktoré môžu byť sediace alebo pedikulantné, pochádzajúce z granulárnych buniek, ktorých funkciou je tvorba hlienu (Rawla a kol., 2019). Časom sa v deliacich bunkách polypov môžu akumulovať genetické zmeny, pomocou ktorých získavajú tieto bunky schopnosť napadnúť stenu hrubého čreva, prenikať a rozširovať sa v lymfatických uzlinách a nakoniec metastazovať do vzdialených orgánov (Simon, 2016). Iba zhruba 10% všetkých adenómov progreduje do invazívnej rakoviny, pričom riziko stúpa spolu s rastom polypov. Invazívna rakovina vznikajúca z adenómov tzn. adenokarcinóm predstavuje 96% všetkých CRC (Rawla a kol., 2019). Na vzniku polypov sa podieľajú enviromentálne rizikové faktory ako diéta, obezita, nedostatok fyzickej aktivity, fajčenie alebo nadmerná konzumácia alkoholu. Okrem enviromentálnych rizikových faktoroch sa na vzniku kolorektálneho karcinómu podieľajú aj dedičné faktory. Pozitívna rodinná anamnéza sa podieľa na vzniku kolorektálneho karcinómu u 10-20% všetkých pacientov, s rôznym rizikom v závislosti na počte postihnutých príbuzných a veku pacienta. Na vývoji CRC sa taktiež podieľajú i zápalové ochorenia hrubého čreva, rasové a etnické zaradenie (Simon, 2016).

3.2.1 Molekulárny princíp vzniku CRC

Jedným z hlavných aspektov vzniku CRC je akumulácia genetických a epigenetických zmien, ktoré zmenia normálnu epiteliálnu bunku na nádorovú. Mutácie DNA je možné získať alebo zdediť (Obr. č. 1; Simon, 2016). Medzi dedičné mutácie spojené s CRC patrí Lynchov syndróm, ktorý vykazuje zmeny v systéme na opravu nesúladu DNA (MMR gény). Obvykle zahŕňajú mutácie v zárodočnej línii v jednom z génov MMR ako MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2 (Kastrinos a Syngal, 2011; Grady a Markowitz, 2014). V dôsledku týchto defektov sa hromadia a neopravujú mikrosatelitové DNA sekvencie (tzv. nestabilita mikrosatelitov), ale predovšetkým môžu byť zasiahnuté aj onkogény alebo nádorové supresory, čo vedie ku karcinogenéze. Familiárna adenomatózna polypóza je druhý najbežnejší dedičný syndróm, ktorý je

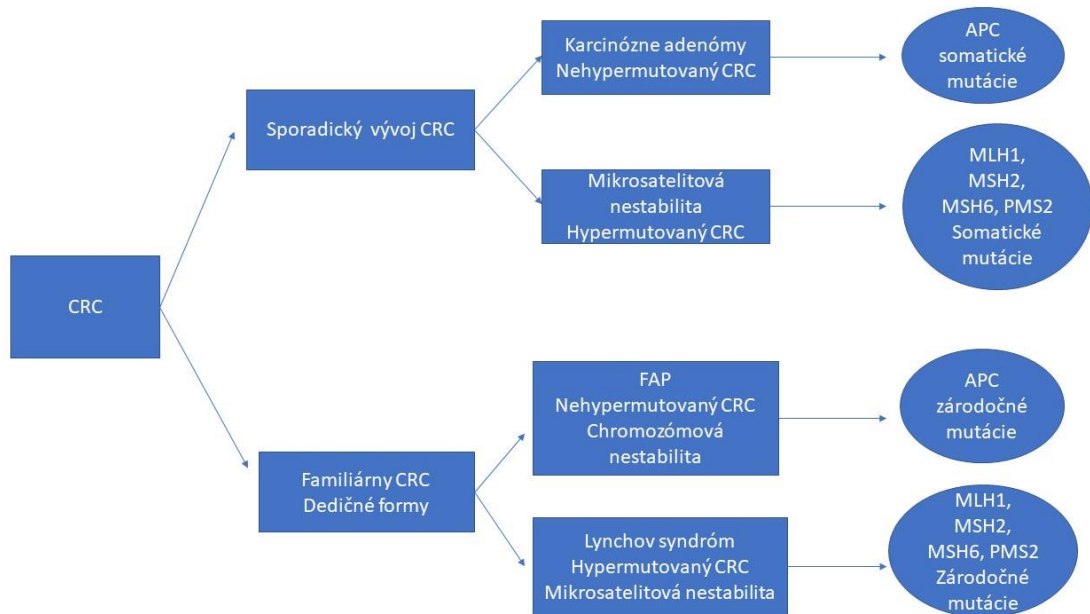
spôsobený zárodočnou mutáciou v géne pre adenomatóznou polypózu (APC). APC je tak radený ako nádorový supresorový gén a strata jeho funkcie vedie v bunkách epitelu hrubého čreva k neoplastickej transformácii (Kastrinos a Syngal, 2011). Normálnou funkciou APC génu je inhibovať β -katenín a riadiť bunkovú proliferáciu. β -katenín reguluje transdukcii rastového bunkového signálu. Mutantný APC však nedokáže odbúravať β -katenín, ten sa hromadí v cytoplazme a prenáša do jadra, čím moduluje transkripčnú aktivitu mnohých onkogénov ako napr. MYC. Medzi ďalšie dominantne dedičné syndrómy patrí: (1) Peutz-Jeghersov syndróm, charakterizovaný hamartomatóznymi polypmi v gastrointestinálnom trakte, spôsobený mutáciami v géne LKB1/STK11 (tumorovo supresorový gén pre serín/threonín kinázu) a (2) juvenilný polypózny syndróm, spôsobený mutáciami v géne SMAD4 alebo BMPR1A. Recessívne dedičná je MUTYH asociovaná polypóza, spôsobená bialelickou mutáciou v géne MUTYH, kódujúcom DNA glykosylázu, ktorá je zodpovedná za opravu oxidačného poškodenia DNA.

Bežne identifikovaná u pacientov s CRC je strata ramienka 17q, kde sa nachádza nádorový supresor p53. Jeho inaktivácia zapríčiňuje nadmernú bunkovú proliferáciu, čím podporuje progresiu nádoru. Mutácia v TP53 je častejšia u nehypermutovaných CRC v porovnaní s hypermutovanými CRC (s nestabilitou mikrosatelitov). Strata heterozygotnosti v 18q vedie ku zmenám v génoch SMAD2, SMAD4 a SMAD7, ktoré sú transkripčné mediátory signalizácie transformujúceho rastového faktoru β (TGF- β). TGF- β reguluje bunkový rast, diferenciáciu, apoptózu a podporuje aktiváciu MYC onkogénu (Hong, 2018; Calvert a Frucht, 2002).

Svoju úlohu na vývoji CRC majú aj epigenetické mechanizmy, medzi ktoré patrí metylácia cytozínových báz v sekvenciách bohatých na CG, nazývaných CpG ostrovy. CpG ostrovy pokrývajú promótorovú oblasť 60-70% génov a sú chránené pred metyláciou. V dôsledku narušenia ochrannej bariéry sa môžu stať aberantne metylovanými pri vývoji rakoviny (Lao a Gardy, 2011). Takto môžu byť umlčané nádorové supresory, čo vedie ku klonálnemu rastu tumorogénnych buniek (Grady a Markowitz, 2014).

Na vzniku CRC sa taktiež podieľajú aj bodové mutácie, napr. v KRAS génoch (patriacim ku RAS proto-onkogénom). RAS proto-onkogény regulujú kľúčové signálne dráhy vrátane fosfoinozitol-3-kináz (PI3K) a mitogénom aktivovaných proteínkináz (MAPK), podieľajú sa na transdukcii intracelulárneho signálu a sú zodpovedné za

aktiváciu signalizácie EGFR. Mutácie v akomkoľvek géne RAS sa vyskytujú u 20-25% všetkých ľudských nádorov, z ktorých 85% predstavuje mutácia v géne KRAS. Primárna mutácia v KRAS má za následok hyperplastické zmeny, ak sa k mutácii KRAS pridá mutácia APC adenóm progreduje do rakoviny. CRC s mutantným KRAS bývajú zväčša rezistentné na anti-EGFR protilátky, ako sú cetuximab a panitumumab (Tan a Du, 2012; Hong, 2018).



Obr. č. 1: Schématický vývoj CRC podľa vzniku mutácií (upravené podľa Aghabozorgi a kol., 2019)

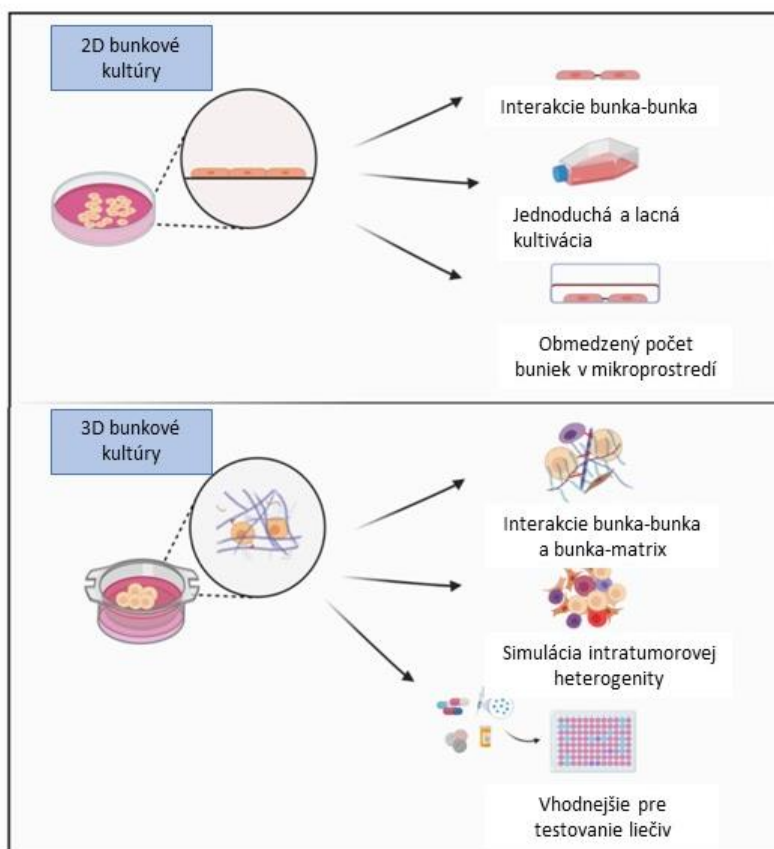
3.2.3 Liečba CRC

Výber vhodnej liečby CRC závisí od niekoľkých faktorov, vrátane zdravotného stavu pacienta, veľkosti nádoru a jeho umiestnenia. Chirurgický zákrok je najbežnejšou možnosťou liečby. Ak sa nadmerná proliferácia nachádza iba v jednom polype je možné ju odstrániť už počas kolonoskopie. Ak však rakovina zasiahla väčšiu oblasť, je nevyhnutelná resekcia čreva, úplné chirurgické odstránenie primárneho nádora a regionálnych lymfatických uzlín. V čase resekcie je približne u 30-40% pacientov s CRC diagnostikované ochorenie v štádiu II (Deschoolmeester a kol., 2010; Marley a Han, 2016). Ak nie je možné chirurgicky odstrániť celý nádor, alebo došlo už k metastazovaniu, je indikovaná chemoterapeutická liečba. Najbežnejšie chemoterapeutické liečivo používané na liečbu CRC je 5-fluórouracil (5-FU) (Marley a Nan, 2016). Fluóruracil inhibuje tymidylát syntázu, enzým syntetizujúci pyrimidínové nukleotidy. Zvyčajne sa podáva spolu s leukovorínom alebo redukovaným folátom, ktorý

stabilizujú väzbu na tymidylát syntázu, čím zvyšujú inhibíciu syntézy DNA (Meyehardt a Mayer, 2005). Viaceré štúdie ukázali, že kombinácia dvojitej chemoterapie pozostávajúcej z fluórouracilu a irinotekanu alebo oxaliplatiny (FOLFIRI alebo FOLFOX) má lepšiu účinnosť ako monoterapia 5-FU (Stintzing, 2014). Irinotekan je polosyntetický derivát alkaloidu kamptotecínu a inhibuje topoizomerázu I, enzým katalyzujúci zlomenie a opätovné spojenie vlákien DNA počas replikácie DNA. Oxaliplatina je zlúčenina, ktorá tvorí DNA adukty, čo vedie ku zhoršeniu replikácie DNA a bunkovej apoptóze (Wolpin a kol., 2007). Adjuvantná chemoterapia s 5-FU sa považuje za štandardnú liečbu CRC v štádiu II a III. Avšak liečba 5-FU pri kolorektálnom karcinóme spôsobenom mikrosatelitovou nestabilitou (Lynchov syndróm) má menšiu účinnosť. Ďalšie možnosti liečby CRC sú použitím cieľených terapií založených na protilátkach. Jedná sa hlavne o anti-VEGFR protilátky (Bevacizumab, Ziv-aflibercept, Ramucirumab) a anti-EGFR protilátky (Cetuximab, Panitumumab). Použitie anti-EGFR liekov u neselektovaných pacientov s CRC vykazovala zníženú účinnosť. To mohlo byť spôsobené prítomnosťou genetických zmien v dráhe EGFR, ktoré zapríčínujú rezistenciu na tieto protilátky. Tento fenomén sa nazýva primárna alebo vnútorná rezistencia. So stratou účinnosti anti-EGFR protilátok koreluje prítomnosť viacerých mutácií v KRAS a NRAS. Napriek výnimočnému pokroku v liečbe veľká časť pacientov naďalej nereaguje na liečbu, preto sú neustále potrebné ďalšie klinické výskumy a skúšky aby sa všetkým pacientom zaručila geneticky prispôbena liečba (Martini a kol., 2017). U niektorých pacientov môže byť účinná vyššie zmienená imunoterapia. V klinickom testovaní je tiež rada nových nízkomolekulárnych inhibítorov. Výber vhodnej terapie bude možný jednak pomocou presnej genetickej charakterizácie nádorov pomocou sekvenovania a tiež pomocou ex-vivo testovaní patientských tkanív alebo organoidov (DeHaan a kol. 2020).

3.3 *In vitro* kultivačné modely

Základným nástrojom v *in vitro* štúdiu nádorov sú **dvojrozmerné (2D) bunkové kultúry**, ktoré sú používané viac ako storočie a umožňujú pochopiť biologické mechanizmy v bunkách. Významne prispeli k pochopeniu karcinogenézy od bunkovej proliferácie a migrácie až po vývoj a testovanie nových liekov. V 2D kultúrach bunky rastú ako monovrstvy, čo vedie k polarizovanej bunkovej adhézii a dvojrozmernému kontaktu so susednými bunkami. Táto fyzikálna charakteristika im umožňuje prijímať z média homogénne množstvo živín a rastových faktorov, čo vedie k abnormálnemu rozšíreniu buniek, nereálnej distribúcii receptorov bunkového povrchu a k výberu špecifických bunkových subpopulácií, ktoré sú najlepšie prispôbené na rast *in vitro* (Hoarau-Véhot a kol., 2018). Aj keď 2D kultúry významne pomohli nášmu pochopeniu bunkového správania, je dokázané, že 2D modely vedú k bunkovým bioaktivitám, ktoré sa líšia v *in vivo* reakciách. Niektoré dôležité vlastnosti nádorových buniek ako je ich morfológia alebo heterogenita nádoru nie sú správne modelované v 2D kultúrach. 3D bunkové kultúry pomáhajú zachovať pôvodný tvar, polarizáciu, heterogenitu nádorových a stromálnych buniek (Obr. č. 2; Hoarau-Véhot a kol., 2018). Bunky pochádzajúce z tkanív darcov, ktoré sú kultivované ako mnohobunkové trojrozmerné štruktúry lepšie simulujú architektúru pôvodného tkaniva ako tradičné dvojrozmerné modely. Táto vlastnosť vyplýva zo správnych interakcií medzi bunkami a interakcií buniek s extracelulárnym prostredím. Bunky môžu prijímať stimuly z lokálneho prostredia, rovnako ako sa to deje v *in vivo* nádoroch (Kapałczyńska a kol., 2016).



Obr. č. 2: Schématická ilustrácia rozdielov medzi 2D a 3D bunkovými kultúrami (upravené podľa Hassan a kol., 2021)

Porovnanie vývoja buniek a ich interakcií v rámci 2D a 3D bunkových kultúr:

Proliferácia: vyššiu rýchlosť proliferácie vykazujú 2D bunkové kultúry v porovnaní s 3D kultúrami a to pri väčšine testovaných nádorových bunkových líniiach. Zvýšená proliferácia buniek môže byť spôsobená tým, že v 2D kultúrach bunky rastú v monovrstve čo im umožňuje prijímať rovnaké množstvo živín a rastových faktorov z média. V 2D kultúrach dominujú proliferačné bunky v porovnaní s 3D kultúrami, kde sú bunky rôzneho typu (proliferačné, quiescentné, apoptické, hypoxické a nekrotické; Souza a kol., 2018). Pri raste sféroidov sa vytvárajú zóny od povrchu do jadra, kde proliferačné bunky sú na povrchu, normoxické quiescentné zóny v strede a hypoxické zóny v jadre. Hypoxická zóna v jadre veľkých sféroidov sa pri ďalšom raste môže zmeniť na nekrotickú (Thoma a kol., 2014).

Migrácia: migrácia buniek sa v závislosti na type kultivácie líši, čo je potenciálne zapríčinené zložitejšími bunkovými interakciami v 3D, ktoré spôsobujú zmeny v pohyblivosti a aktivite buniek. Migrácia v 2D kultúrach sa riadi klasickou

polarizovanou signalizáciou a mechanickými vzormi, ktoré často nie sú rozhodujúce pre efektívnu migráciu v 3D. Okrem toho bunky kultivované 2D alebo 3D často neexprimujú rovnaké povrchové proteíny (Duval a kol., 2017; Hoarau-Véchet a kol., 2018).

Extracelulárna matrix (ECM): obsahuje multifaktoriálne signály spúšťajúce bioaktivitu a regulujúce bunkové procesy. Tieto signály sú determinované mechanicky, chemicky alebo topograficky. Pre čiastočnú simuláciu ECM môžu byť bunky v 2D kultivované spolu s kolagénom alebo fibronektínom (Duval a kol., 2017). Pri kultivácii 3D modelov možno vytvárať natívnu extracelulárnu matrix, použitím matrice (Ravi a kol., 2014).

Chemoterapeutická rezistencia: nedávne štúdie preukázali, že sformovanie buniek do sféroidov ich môže chrániť pred apoptózou indukovanou chemoterapeutikami. V 2D kultúrach nie je prístup k živinám (alebo aj cytostatikám) ovplyvnený gradientom buniek, pretože nekrotické bunky sa oddeľujú od povrchu a na povrchu zostávajú iba živé bunky. Napríklad v agregovaných sféroidoch je najrýchlejšia proliferácia na povrchu sféroidov a vo vnútri sú quiescentné a nekrotické bunky. Quiescentné bunky sú menej citlivé na liečbu, a preto môžu slúžiť ako zárodok opätovného rastu nádorov (Duval a kol., 2018). 3D modely lepšie reprezentujú nádor a poskytujú reálnejšiu odpoveď na liečivo v porovnaní s 2D kultúrami (Hoarau-Véchet a kol., 2018; Kapalczyńska a kol., 2016; Souza a kol., 2018).

3.3.1 Charakteristika trojrozmerných (3D) bunkových kultúr

V ideálnom prípade fyzikálne, bunkové a molekulové charakteristiky 3D modelov znamenajú, že zdieľajú podobné fyziologické procesy s *in vivo* diferencovaným epitelom a umožňujú biologicky relevantné interakcie bunka-bunka a bunka-matrix (Hynds a Giangreco, 2013). Konvenčné 3D tumorové modely, známe ako nádorové sféroidy, môžu vzniknúť formáciou jednotlivých nádorových buniek (homotypické sféroidy) alebo ko-kultiváciou spolu s inými typmi buniek (heterotypické sféroidy; Abolkheyr Es a kol., 2018). Sféroidy vykazujú nízku podobnosť s primárnymi nádormi, napriek tomu bunky napodobňujú metabolické a proliferačné gradienty v *in vivo* nádoroch a vykazujú chemorezistenciu (Ishiguro a kol., 2017). Proces formácie sféroidov prechádza viacerými štádiami, počínajúc iniciačnou agregáciou jednotlivých vysadených buniek. Vďaka 3D tvaru vo vnútri vzniká chemický gradient, čo vedie k vytvoreniu zón

z povrchu do jadra, k podobnej zonácii dochádza u rastúcich nádorov *in vivo*. Kvôli difúznemu limitu kyslíka sa sféroidy v strede stávajú hypoxickými, to môže viesť k nekróze u sféroidov s väčším priemerom. Dynamika rýchlosti rastu reprodukuje tuhý nádor v *in vivo* charakterizovaný skorou exponenciálnou fázou, po ktorej nasleduje fáza poklesu rýchlosti rastu spojená so zvýšením počtu neproliferujúcich a nekrotických buniek. Rôzne sféroidné ko-kultivačné metódy nádorových buniek spolu so stromálnymi bunkami umožňujú štúdium heterológnych interakcií v nádorovom tkanive. Najčastejšie sa spolu s nádorovými bunkami ko-kultivujú imunitné bunky, fibroblasty a endotelové bunky. (Weiswald a kol., 2015). Kultúra buniek v 3D, poskytuje fyziologicky relevantnejšie mikroprostredie, ktoré môže napodobňovať prirodzené mikroprostredie nachádzajúce sa *in vivo*. To sa obvykle skladá z kolagénu, fibrínu, elastínu, kyseliny hyalurónovej, proteoglykánov, rastových faktorov a cytokínínov. Zloženie a vlastnosti materiálu, v ktorom sú bunky kultivované, výrazne ovplyvňuje bunkové správanie. Tieto metódy môžeme široko kategorizovať do dvoch skupín a to na bezmatricové a matricové systémy (Obr. č. 2; Fitzgerald a kol., 2015; Knight a Przyborski, 2014).

Bezmatricové metódy kultivácie :

1. **Metóda visiacej kvapky:** pri tejto technike sa kvapky bunkových suspenzií nanášajú na vnútornú stranu závesného viečka, ktoré je následne umiestnené na platňu s kvapalinou na udržanie vlhkej atmosféry. Bunky sa koncentrujú v špičke kvapky, na rozhraní vzduch – kvapalina, spontánne agregujú a nakoniec vytvárajú sféroidy. Táto metóda je jednoduchá a konzistentná, umožňuje produkciu jedného sféroidu na kvapku pre rôzne bunkové línie a zachováva prirodzené bunkové interakcie.
2. **Spontánne formovanie sféroidov na ne-adherentných povrchoch** (ultra low attachment surface): v tejto metóde sa používajú kultivačné nádoby, s povrchom pokrytím inertným substrátom ako je agar alebo poly-2-hydroxyetylmetakrylát (poly-HEMA), ktorý bráni bunkám k prichyteniu sa na povrch, čím ich núti agregovať a vytvárať sféroidy. Povlak inertného substrátu je stabilný, necytotoxický a nedegradovateľný.
3. **Suspenné kultúry:** princípom tejto metódy je vložiť bunkovú suspenziu do nádob, kde nepretržité miešanie bráni bunkám prilnúť k stenám nádoby a podporí ich medzibunkové interakcie. Pri tejto metóde sa využívajú rotačné banky a bioreaktory (Hoarau-Véhot a kol., 2018).

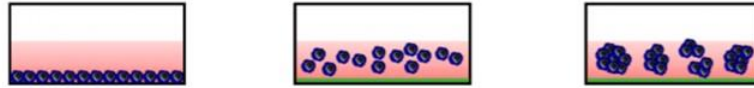
Matricové metódy kultivácie:

1. **Matrice:** Medzi najbežnejšie používané matrice sa radí kolagén, fibronektín, želatína, laminín, vitronektín. Konkrétny typ matrice umožňuje vyvolať požadovanú zmenu morfológického a fyziologického správania kultivovaných buniek. V súčasnosti sa používa viac ako 100 druhov rôznych matric organickej i anorganickej povahy, generujú sa pomocou rôznych prírodných a syntetických látok. Tieto kompozície svojou pórovitosťou, permeabilitou a mechanickou stabilitou vytvárajú natívnu extracelulárnu matrix. 3D matrice poskytujú bunkám biologicky aktívne prostredie na proliferáciu, diferenciáciu a vylučovanie špecifickej extracelulárnej matrix (Ravi a kol., 2014). Príkladom prírodných matric sú matrigél alebo kolagén, ktoré umožňujú správne medzibunkové interakcie (Hoarau-Véchet a kol., 2018). Matrigél obsahuje laminín, entaktín, proteoglykány, kolagén IV a znížený obsah rastových faktorov (Abolkheyr Es a kol., 2018).
2. **Hydrogély:** hydrogély sú špecifickou triedou matric s odlišnou štruktúrou. Sú to vodou napučané matrice, ktoré pozostávajú zo zosieťovaných hydrofilných polymérov. Hydrogély sú fyzicky slabé, ale poskytujú, biomimetické prostredie na podporu bunkovej proliferácie a diferenciácie. Sú vhodné na imitáciu mäkkých tkanív a dajú sa ľahko modifikovať (Fitzgerald a kol., 2015). Agarózové hydrogély sú príkladom jednoduchých matric pre kultiváciu viacerých typov buniek (Ravi a kol., 2014).
3. **Decellularizované tkanivá / orgány:** matrice získané odstránením buniek z tkanív a orgánov sa úspešne používajú na aplikáciu tkanivového inžinierstva. Pre vytvorenie decellularizovaných matric sa bunky odstránia z tkaniva alebo orgánu a tam zostanú iba štrukturálne a funkčné proteíny ECM. Nevýhodou je, že počas procesu odstraňovania buniek môže prísť aj k poškodeniu proteínov ECM.
4. Medzi ďalšie kultivačné techniky patria mikrofluidné platformy alebo bioprinting (Fitzgerald a kol., 2015; Hoarau-Véchet a kol., 2018).

A. Metóda visiacej kvapky



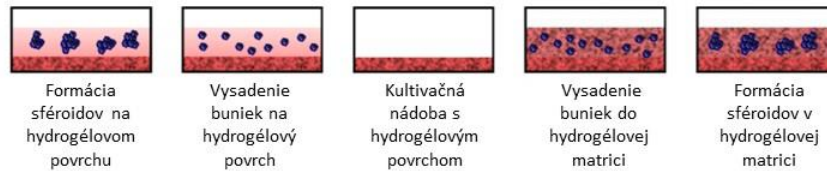
B. Spontánna formácia sféroidov „low attachment“ kultivačných nádobách



C. Suspenzná kultivácia sféroidov



D. Matricová kultivačné modely

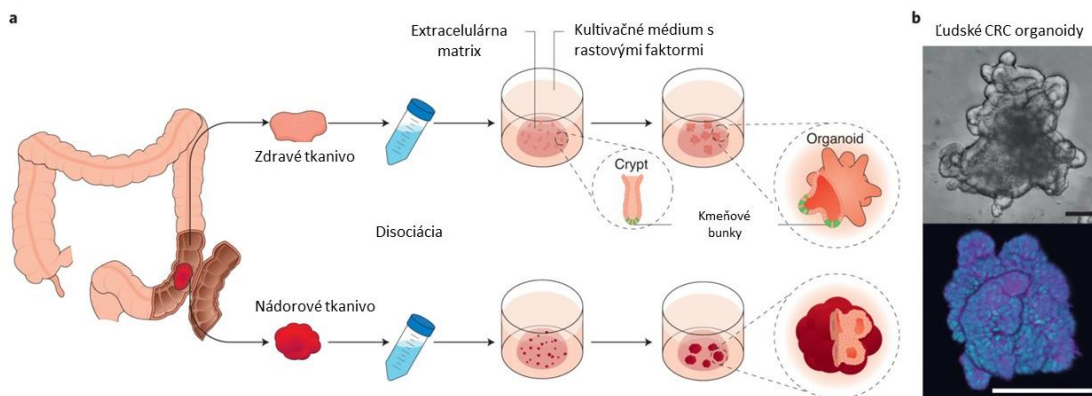


Obr. č. 3: Kultivačné techniky využívané k vytváraniu 3D modelov (upravené podľa Hoarau-Véchet a kol., 2018).

3.3.3 Organoidy odvodené od nádorov

Organoidy sú definované ako rastúca 3D bunková štruktúra z kmeňových buniek, ktoré sú orgánovo špecifické a samo-organizujúce. Organoidy môžu vzniknúť z dvoch typov kmeňových buniek: (1) pluripotentné embryotické (ES) a indukované pluripotentné bunky (iPS), (2) orgánovo špecifické dospelé kmeňové bunky (aSCs). Bunky ES a iPS sa súhrne nazývajú aj pluripotentné kmeňové bunky, majú vysoký potenciál proliferácie aj mimo tela. Naopak pri bunkách aSCs sa dlho verilo, že nie sú schopné výraznej proliferácie mimo tela. Napriek tomu sa v posledných rokoch vyvinulo veľa rôznych rastových faktorov imitujúcich špecifické orgánové prostredie kmeňových buniek (Clevers, 2016). Metódy kultivácie nádorových organoidov odvodených od pacientov sa líšia v závislosti na type tkaniva. Kultivácia je iniciovaná mechanickým a enzymatickým štiepením nádorového tkaniva na malé kúsky, po ktorom nasleduje inokulácia buniek do 3D matrice (väčšinou sa jedná o Matrigel; Obr. č. 4). Bunková architektúra organoidov a ich správanie sa závisí od zloženia matrice. Parakrinná signalizácia je simulovaná mixom rôznych faktorov špecifických pre nádorové tkanivo.

Medzi najbežnejšie používané faktory patria Wnt3A, R-spondín-1, epidermálny rastový faktor a morfogenický antagonista Noggin (Abolkheyr Es a kol., 2018). Relatívna ľahkosť expanzie a údržby organoidov umožňuje mnoho alternatívnych spôsobov hodnotenia reakcií na liečbu. Kvôli rozdielnym kritériám ako je dostupná veľkosť biopsie, rýchlosť expanzie organoidov a pasážovanie, sa analýza môže líšiť. Organoidy možno jednoduchšie geneticky modifikovať ako xenoimplantáty alebo tkanivové rezy. Ako možno odvodiť organoidy z biopsie pacienta, možno aj potenciálne predpovedať reakciu pacienta na liečbu (Nagle a kol., 2018). Napriek tomu, že je známych zhruba 12 signálnych dráh, ktoré riadia tumorigenézu CRC, každý nádor má odlišné genetické zmeny ako aj intratumorálnu heterogenitu, ktorá definuje ako patológiu tak aj reakciu na liečbu. Črevné organoidy poskytujú príležitosť lepšie prispôbiť liečbu individuálne pacientom s CRC. Nové techniky kultivácií umožňujú kultiváciu organoidov odvodených od pacienta spolu s natívnymi imunitnými bunkami vrátane makrofágov, T a B lymfocytov a NK buniek, s cieľom vytvoriť precízne imuno-onkologické vyšetrenia a personalizované imunoterapeutické testy (DeHaan a kol. 2020). V súčasnosti sa podarilo vytvoriť živé organoidové biobanky od veľkého počtu jedincov, ktoré významne prispievajú k základnému aj klinickému personalizovanému výskumu (Schutgens a Clevers, 2020).



Obr. č. 4: Odvodenie organoidov z primárneho kolónového tkaniva a tumorového kolónového tkaniva (a) prehľad procesu vytvárania organoidov (b) mikroskopické snímky ľudských CRC organoidov, horná snímka je vytvorená v svetlom poli a dolná snímka je vytvorená v tmavom poli (upravené podľa od Fujii a Sato, 2020).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Bunková línia HT-29 odvodená od ľudského kolorektálneho karcinómu (ECACC: 91072201, poskytnutá od Mgr. Kateřina Čížková, Ph.D., Ústav histológie a embryológie, LF UP). Pacientské vzorky ľudského kolorektálneho karcinómu boli spracované v spolupráci s Mgr. Levkovou, ktorá je zodpovedná za tkanivovú biobanku na Ústave klinickej a molekulárnej patológie LF UP. Pacienti podpísali informovaný súhlas a spracovanie ich tkanív a *in vitro* kultivácia buniek bola schválená Etickou komisiou Lekárskej fakulty UP a Fakultnej nemocnice v Olomouci.

4.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Serva, kat. č. 1140404)
- BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences, kat. č. 07980)
- CaCl₂ (Sigma, kat. č. C1016)
- Dispáza (gibco, kat. č. 17105-041)
- Dulbecco's Modified Eagle's medium F-12 Nutrient Mixture (DMEM/F-12) (gibco, kat. č. 21041-025)
- Eosin Y disodium salt (Sigma-Aldrich, kat. č. MKCH4781)
- FBS (PAA The cell culture company, kat. č. A15-151)
- Hematoxylín (Sigma-Aldrich, kat. č. SHBM5567)
- MTT (Serva, kat. č. 20395)
- 5-fluorouracil (Ebewe Pharma, kat. č. 732208-OR)
- Oxaliplatina (Ebewe Pharma, kat. č. 44/022/07-C)
- Primárne králičie protilátky CDX2 klon EPR2763Y (Cell Marque, kat.č. 235R-10)
- Primárne myšie protilátky CK20 klon VKS20.8 (Dako, kat. č. M7019)
- Sekundárne protilátky EnvisionTM Dual link system-HRP (Dako, K4061)
- Premývací pufor (Wash Buffer 20x, DAKO, kat. č. K8007)
- Trypsín (gibco, kat. č. 12605-010)
- Trombín (Sigma, kat. č. T4648-1KU)

Použité roztoky a ich príprava

- 0,5 M EDTA (pH 8): na 1 l roztoku, 186,1 g disodnej soli EDTA rozpustených v 900 ml ddH₂O za stáleho miešania. Po rozpustení EDTA upravené pH pomocou NaOH na mierne vyššiu hodnotu a objem doplnený na 1l, následne upravené pH a roztok vyautoklávovaný a uchovávaný pri + 4 °C.
- Príprava hematoxylínu zmiešaním: 800 ml destilovanej vody s 0,8 g hematoxylínu, 40 g síranu hlinito-draselného, 0,16 g jodičnanu sodného a 0,8 g kyseliny vínnej.
- 10x PBS: navážka na 2 l roztoku; 160 g NaCl, 4 g KCl, 64,2 g Na₂HPO₄, 4 g KH₂PO₄, doplnená ddH₂O na 2 l, zmes rozpustená a uchovávaná pri laboratórnej teplote.
- 1x PBS: riedenie na 2 l roztoku; 200 ml 10x PBS, doplnených do 2 l ddH₂O, zmes rozpustená, vyautoklávovaná a uchovávaná pri teplote +4 °C.
- 10% Formalín
- 10% SDS
- Príprava CRC média podľa tab. č. 1:

Tab. č. 1: Príprava CRC média

Látka	Objem	Firma	Kat.č.
N2 supplement	100 µl	Gibco	17502-048
B27 supplement	200 µl	Gibco	17504-044
N-acetylcystein	20 µl	Sigma	A9165
Noggin	10 µl	Peprtech	120-10C
EGF	25 µl	Invitrogen	PHG0311
*R-spondín	4 ml	-	-
FGF 10	10 µl	Gibco	PH0204

Pokračovanie tab. č. 1

*Wnt3A	2 ml	-	-
Y-27632	2 μ l	Santa Cruz Biotechnology	SC-281642
A83-01	4,21 μ l	Sigma	SML0788
SB202190	3,31 μ l	Gibco	S7067
Nikotínamid	244,2 μ l	Sigma	N0636
(leu15)-gastrín	1 μ l	Sigma	69145

*kondicionované médium produkované bunkami HEK293T, aktivita testovaná Luciferase assay system (Promega, kat. č. E32940)

- Príprava kompletného média adDMEM: Do základného média DMEM/F-12 (gibco) bol pridaný HEPES (10 mM, Thermo Fisher), glutamax (2 mM, Sigma-Aldrich), antibiotiká penicilín (1 U/ml, Invitrogen) a streptovidín (1 U/ml, Invitrogen).

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- Autokláv Personal Microwave Autoclave (MICROJET)
- Centrifuga IEC CL31R Multispeed (Thermo SCIENTIFIC)
- Centrifuga 3K30 SIGMA (Laborzentrifugen)
- Centrifuga MiniSpin (eppendorf)
- Inkubátor HERA cell (Heraeus)
- Laboratórna váha (KERN ew)
- Laminárny box MSC Advantage (Thermo SCIENTIFIC)
- Mikroskop TS 100 (Nikon ECLIPSE)
- Mikroskop (Leika) s kamerou DP73 (Olympus)
- Mikroskop BX 43 (Olympus) s kamerou U-CMAD3 (Olympus)
- Spektrofotometer PowerWave XS (BIO-TEK)
- Trepacia vodná lázeň (Wisd)
- Vodná lázeň TW8 (Julabo)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Pasážovanie buniek

Po odliati média, boli bunky 3x opláchnuté roztokom 1x PBS (asi 3 ml), následne bolo pridaných 500 μ l trypsínu a bunky spolu s trypsinom boli vložené na zhruba 4 min do inkubátoru. Po vytiahnutí kultivačnej nádoby s bunkami z inkubátoru bolo do nádoby pridané médium tak aby sa zo steny kultivačnej nádoby uvoľnili bunky. Táto bunková suspenzia bola premiestnená do čistej skúmavky a bola zcentrifugovaná na 23°C / 250 g / 5 min. Po centrifugácii bol zliaty supernatant a bunky boli resuspendované v 2 – 3 ml média. Do kultivačnej nádoby bolo napipetovaných 5 ml média a vrátených zhruba 20% bunečnej suspenzie. Kultivačná nádoba s bunkami bola vložená do inkubátoru.

4.4.2 Ovplyvnenie buniek cytotoxickými látkami

Po pasážovaní buniek boli bunky spočítané v Bürkerovej komôrke a vysadené po 6000 buniek do 96-jamkovej dosky. Bunky rástli 48 hod. Následne boli bunky ovplyvnené cytotoxickými látkami o zvolených koncentráciách, konkrétne sa jednalo 5-fluorouracil (o koncentráciách 10 mM, 1 mM a 0,1 mM), oxaliplatinu (o koncentráciách 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M), zmesou týchto látok a doska bola vložená do inkubátora. Po troch dňoch bol vykonaný MTT test, do 96-jamkového panelu bolo doplnených 10 μ l MTT, ktorý pôsobil približne 4 hod. Po 4 hod bolo doplnených 100 μ l 10% SDS. Po 24 hod bola 96-jamková doska s bunkami spektrofotometricky zmeraná pri vlnovej dĺžke 570 nm a bola vyhodnotená viabilita buniek.

4.4.3 Kultivácia multiceľulárnych sféroidov v „low-attachment“ nádobách

Bunky boli vysadené po 500 000 buniek/ml do „low-attachment“ kultivačnej nádoby (Corning low attachment surface flask (Sigma)) v DMEM médiu bez FBS. Po troch hodinách bolo doplnené do média FBS tak aby jeho koncentrácia bola 1%, bunky boli inkubované pri 37 °C a 5% CO₂. Po 24. hodinách bola navýšená koncentrácia FBS na 10% a sféroidy boli kultivované ďalších 5 dní v inkubátore.

4.4.4 Kultivácia multiceľulárnych sféroidov v jamkách s 1,5% agarózou a ich ovplyvnenie cytotoxickými látkami

Bola pripravená 1,5% agaróza v DMEM médiu bez suplementov, zmes bola následne vyautoklavovaná (110 °C). Za účelom udržania tepla bola fľaša s agarózou umiestnená do polystyrénovej nádoby a pomocou opakovacej pipety bola agaróza rozpipetovaná

po 50 µl do 96- jamkovej dosky. Po stuhnutí agarózy na ňu bola napipetovaná bunková suspenzia po 10 000 buniek. Doska bola obalená parafilmom a zcentrifugovaná pri 22 °C / 151 g / 15 min. Po zcentrifugovaní bol odstránený parafilm a doska bola vložená do inkubátora, kde bola inkubovaná 72 hod. pokým sa nevytvorili sféroidy. Následné boli sféroidy ovplyvnené cytotoxickými látkami o zvolených koncentráciách, konkrétne sa jednalo 5-fluorouracil (o koncentráciách 10 mM, 1 mM a 0,1 mM), oxaliplatinu (o koncentráciách 100 µM, 10 µM a 1 µM) a zmesou týchto látok, doska bola vložená do inkubátoru. Po troch dňoch boli sféroidy vyfotené a vyhodnotila sa ich veľkosť.

4.4.5 Disociácia tkanív

Vzorky (tumor + kontrola) boli prenesené zo sály v 50ml plastových skúmavkách s transportným médiom (5% FBS, 2x konc. ATB) na ľade. Transportné médium bolo zliate a tkanivo bolo opláchnuté 1x PBS, následne bolo tkanivo prenesené na petriho misku a pomocou skalpelu bol odstránený tuk a krvné zrazeniny. Tkanivo bolo zvážené a rozkrájané pomocou skalpelu na čo najmenšie časti, takto rozkrájaná hmota bola premiestená do sterilnej 50ml skúmavky a bolo k nej pridaných 8 ml disociačného média (8 ml HBSS, 100 °C kolagenázy, 20 µl hyaluronidázy) na 1 g tkaniva, následne bola zmes inkubovaná v trepacej vodnej lázni pri 37 °C a 140 rpm. Po 60 min. bola prepitovaná a vrátená späť do trepacej vodnej lázne, následne každých 15 min bol kontrolovaný stupeň rozkladu tkaniva (rozklad trvá 1,5 – 2 hod.). Keď bola zmes už homogénna bolo pridaných 8,3 µl DNázy na 1 g tkaniva a zmes bola inkubovaná ďalších 10 min. K rozloženému tkanivu bolo pridané (v pomere 1:1) 1x PBS vychladené na ľade a zmes bola prepipetovaná. Zmes bola prenesená do 50ml konickej skúmavky (alebo menšej, v závislosti na množstve vzorky) a zcentrifugovaná pri 4 °C / 340 g / 5 min. Po zcentrifugovaní bol odpipetovaný supernatant a pelet bol resuspendovaný v 20 ml teplého kultivačného média s 20% FBS. Suspenzia bola 2x prefiltrovaná, najskôr cez 100 µm, potom cez 70 µm filter a následne zcentrifugovaná pri 22 °C / 340 g / 5 min. Následne bola vykonaná lýza erytrocytov, zmes bola resuspendovaná v 10 ml 1x PBS, bola doliata do 40 ml ddH₂O, 3x ľahko premiešaná prevracaním skúmavky a zcentrifugovaná pri 22 °C / 340 g / 5 min. Pelet bol resuspendovaný v médiu alebo v 1x PBS a boli spočítané bunky pomocou Bürkerovej komôrky, ktoré boli následne vysadené po 100 000 buniek do matrigélu. Po stuhnutí matrigélu bolo doplnených 500 µl média a bunky boli vložené do inkubátoru.

4.4.6 Pasážovanie organoidov

Po odsiati média boli bunky premyté 1x PBS, prenesené do 50ml skúmavky, bolo k nim pridaných 1,5 ml dispázy a suspenzia bola doplnená na 6 ml bazálnym médiom (DMEM/F12). Suspenzia bola uzatvorená na voľno, tak aby mohli prúdiť plyny a prenesená do inkubátora. Po 5. minútach bol kontrolovaný obsah matrigélu prevracaním skúmavky, dispáza pôsobila pokým nezmizol matrigél. Následne bol pridaný roztok EDTA (0,5 M EDTA pipetovaných 100 μ l / 10 ml) a zmes bola zcentrifugovaná pri 300 g / 1 min. Nasledovalo odpipetovanie supernatantu, opláchnutie 1x PBS a centrifugovanie pri 300 g / 1 min. Po odpipetovaní supernatantu bolo pridaných 500 μ l trypsínu, ktorý pôsobil približne 15 min za občasného prepitovania. Následne bola zmes zcentrifugovaná pri 23 °C / 250 g / 2 min bol odliaty supernatant. Jednotlivé bunky boli opláchnuté v 1x PBS, spočítané v Bürkerovej komôrke a rozdelené tak aby boli vysadené po 100 000 buniek. Po spočítaní boli bunky zcentrifugované pri 23 °C / 73 g / 2 min, bol odliaty supernatant. Pelet buniek bol resuspendovaný v matrigéle, tak aby sa nevytvorili bublinky. Bunky boli vysadené po 100 000 po 50 μ l, po stuhnutí matrigélu bolo doplnených 500 μ l CRC média a bunky boli vložené do inkubátora rástli ďalších zhruba 14 dní pokým sa nevytvorili organoidy.

4.4.7 Vytváranie trombínových zrazením a ich fixácia vo formalíne

Bunky boli zcentrifugované pri 23 °C / 72 g / 2 min bol odliaty supernatant a bunky boli opláchnuté v PBS a znovu zcentrifugované. Po odpipetovaní supernatantu bol pelet presuspendovaný v 224 μ l citrátu plazmy a prenieseny do 2 ml mikroskúmavky. K bunkám bolo pridaných 5,6 μ l CaCl₂ (nemiešať) a 23 μ l trombínu (nemiešať). Po vytvorení zrazeniny bola zrazenina pomocou špachtle prenesená na buničinu a farbená v eozíne. Po farbení bola zrazenina preniesená na terčik a zaliata formalínom.

4.4.8 Imunohistochemické farbenie parafínom fixovaných rezov tkaniva

Podložné sklíčka s parafínovými tkanivovými rezmi boli najskôr odparafínované: 3x 6 min v xyléne, 5 min v 96% alkohole, 5 min v 80% alkohole, 5 min v 70% alkohole a nakoniec oplach destilovanou H₂O. Následne boli sklíčka so vzorkami prenesené do PT Linku do pufu EnVision Flex Target Retrieval Solution High pH (1x) a sklíčka boli vložené do prístroju PT Link (Flex systém) pri 97 °C / 20 min. Po vytiahnutí z automatu boli sklíčka vychladené v PT Linku. Vychladené sklíčka boli premyté premývacím pufrom 3x 5 min, následne boli označené miesta s tkanivom na sklíčkach, kde bolo

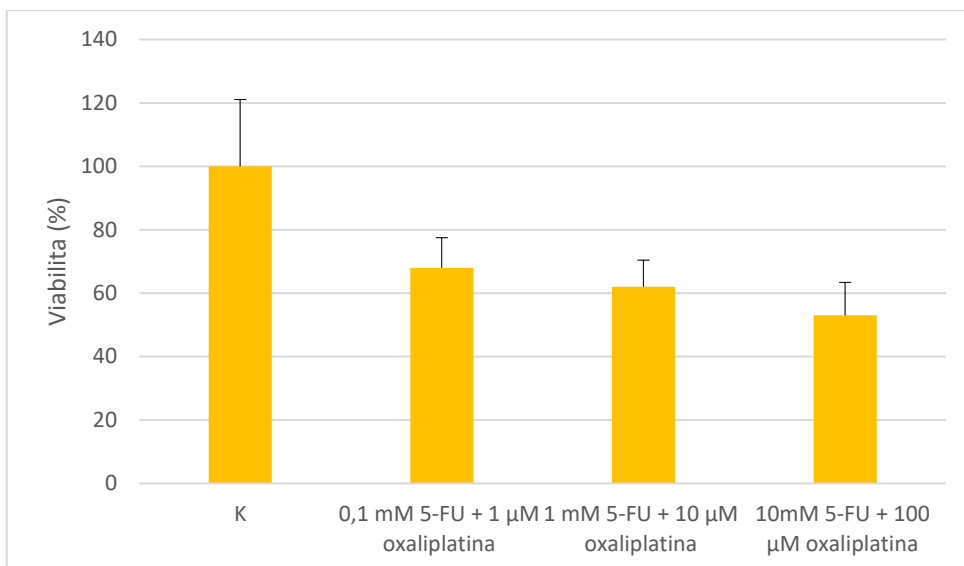
pridaných 100 µl peroxidase-blocking reagent a sklíčka boli oplachované 3x po 5 min v premývacom pufri. Po opláchnutí bolo na vzorky pridaných 100 µl primárnej protilátky (riedená 1:100), vzorky boli inkubované 20 min pri izbovej teplote vo vlhkej komôrke, po sklepaní roztoku primárnych protilátok zo sklíčok boli vzorky premyté premývacím pufrom 3x po 5 min. Následne bolo na vzorky pridaných 100 µl sekundárnej protilátky a vzorky boli inkubované 20 min pri izbovej teplote vo vlhkej komôrke. Po inkubácii boli vzorky premyté premývacím pufrom 3x po 5 min. Po premytí nasledovalo pridanie DAB (do DAB substrátu bolo pridaná 1 kvapka DAB chromogénu a roztok bol zvortexovaný) a 10 min inkubovanie pri izbovej teplote vo vlhkej komôrke. Následne boli vzorky premyté premývacím pufrom po dobu 5 min, opláchnuté pod tečúcou vodou a farbené hematoxylínom. Po farbení hematoxylínom boli vzorky diferencované v čpavkovej vode a bolo skontrolované nafarbenie jadier v mikroskope. Pred nalepením krycieho sklíčka boli vzorky odvodnené v: 96% alkohole 3 min, acetóne 3 min, acetón-xyléne (pomer 1:1) 3 min, xyléne 3 min a pertexom bolo prilepené krycie sklíčko.

5. VÝSLEDKY

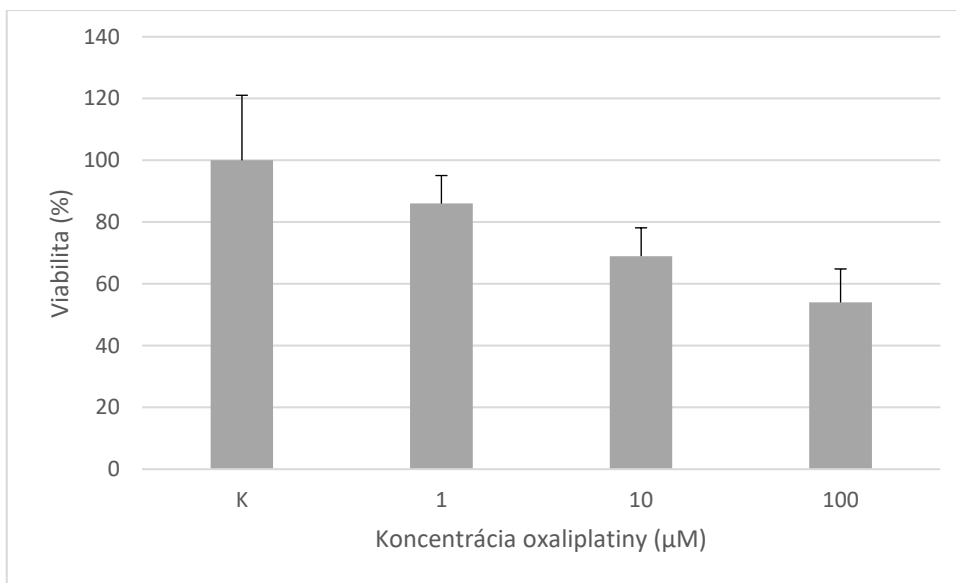
5.1 Vyhodnotenie viability buniek v 2D kultúre po ovplyvnení cytotoxickými látkami

Bunková línia HT-29 bola kultivovaná po 6000 buniek v 96-jamkových platniach podľa postupu 4.4.2. Bunky boli vystavené pôsobeniu cytotoxických látok, 5-fluorouracilu o koncentráciách 10 mM, 1 mM a 0,1 mM; oxaliplatiny o koncentráciách 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M a zmesi týchto dvoch látok o koncentráciách 10mM 5-fluorouracil + 100 μ M oxaliplatina, 1mM 5-fluorouracil + 10 μ M oxaliplatina a 0,1 mM 5-fluorouracil + 1 μ M oxaliplatina. Po 3 dňoch bola hodnotená viabilita buniek vykonaním MTT testu a následným spektroskopickým meraním.

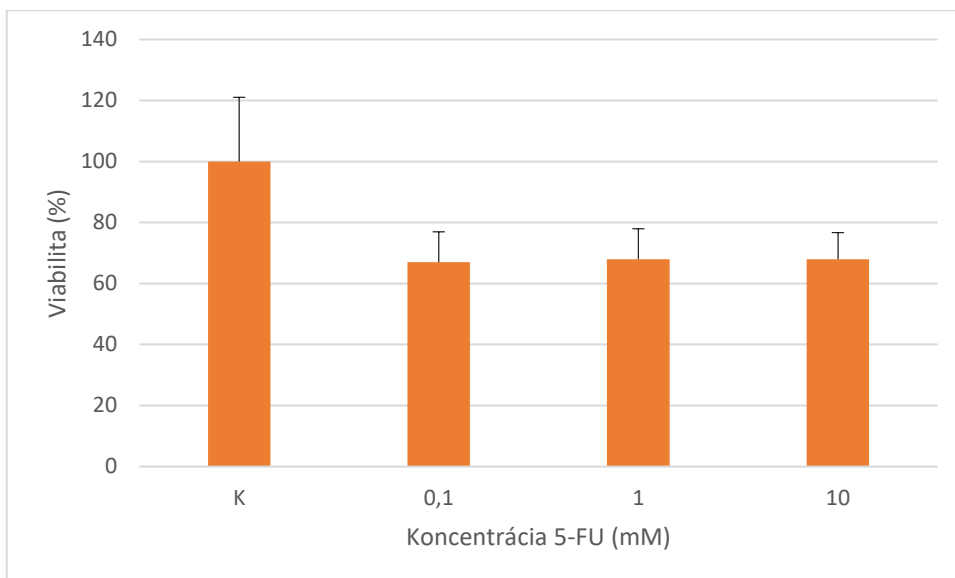
Zo získaných výsledkov viability bolo zistené, že najväčšiu cytotoxicitu na bunky vykazuje zmes oboch použitých cytotoxických látok. Pri najvyššej použitej koncentrácii vykazovali bunky 53% viabilitu, pri strednej koncentrácii bola viabilita buniek 62% a pri najnižšej koncentrácii bola hodnota viability buniek 68% (obr. č. 5). Porovnateľne na viabilitu buniek pôsobila aj samotná oxaliplatina, kedy viabilita buniek pri najvyššej použitej koncentrácii bola 54%, pri strednej koncentrácii bola viabilita 69% a pri najnižšej koncentrácii bola viabilita buniek 86% (obr. č. 6). Viabilita buniek, ktoré boli vystavené pôsobeniu 5-fluorouracilu, vykazovala vyššie hodnoty, ktoré sa napriek rozdielnym použitým koncentráciám od seba veľmi nelíšili. Pri najvyššej použitej koncentrácii bola viabilita buniek 68%, pri strednej bola viabilita buniek 68% a pri najnižšej koncentrácii bola viabilita buniek 67% (Obr. č. 7).



Obr. č. 5: Hodnotenie viability HT-29 buniek v 2D kultúre metódou MTT testu, za pôsobenia zmesi cytotoxických látok 5-fluorouracilu a oxaliplatiny. Experiment bol opakovaný štyrikrát a graf zobrazuje zosumarizované výsledky zo všetkých opakovaní.



Obr. č. 6: Hodnotenie viability HT-29 buniek v 2D kultúre metódou MTT testu, za pôsobenia cytotoxickej látky oxaliplatiny. Experiment bol opakovaný štyrikrát a graf zobrazuje zosumarizované výsledky zo všetkých opakovaní.



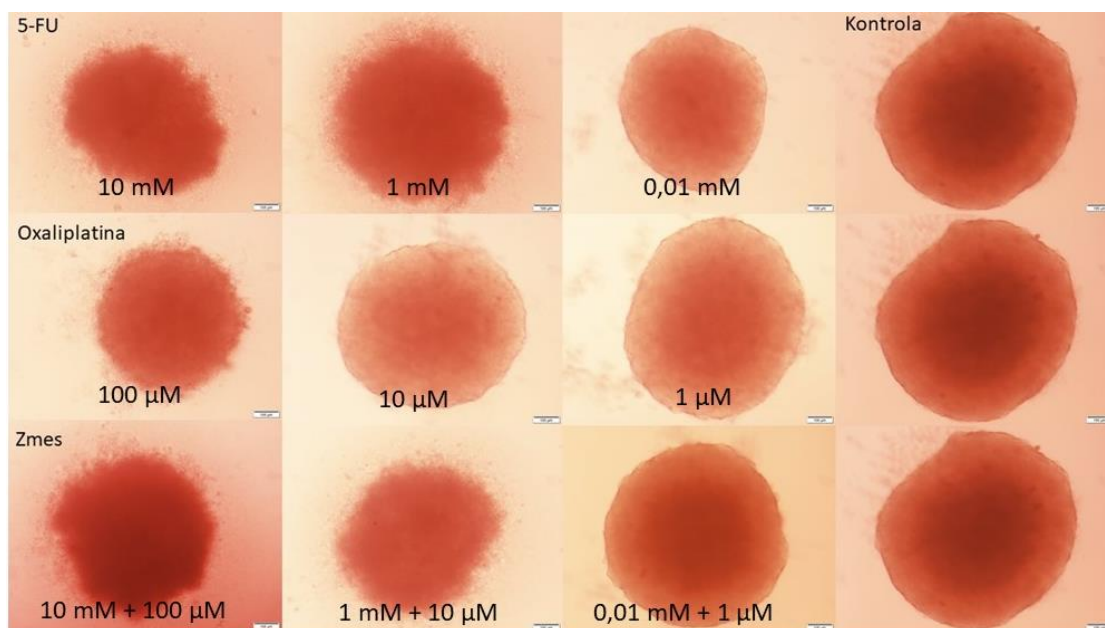
Obr. č. 7: Hodnotenie viability HT-29 buniek v 2D kultúre metódou MTT testu, za pôsobenia cytotoxickej látky 5-fluorouracilu. Experiment bol opakovaný štyrikrát a graf zobrazuje zosumarizované výsledky zo všetkých opakovaní.

5.2 Hodnotenie cytotoxicity na multielulárne sféroidy

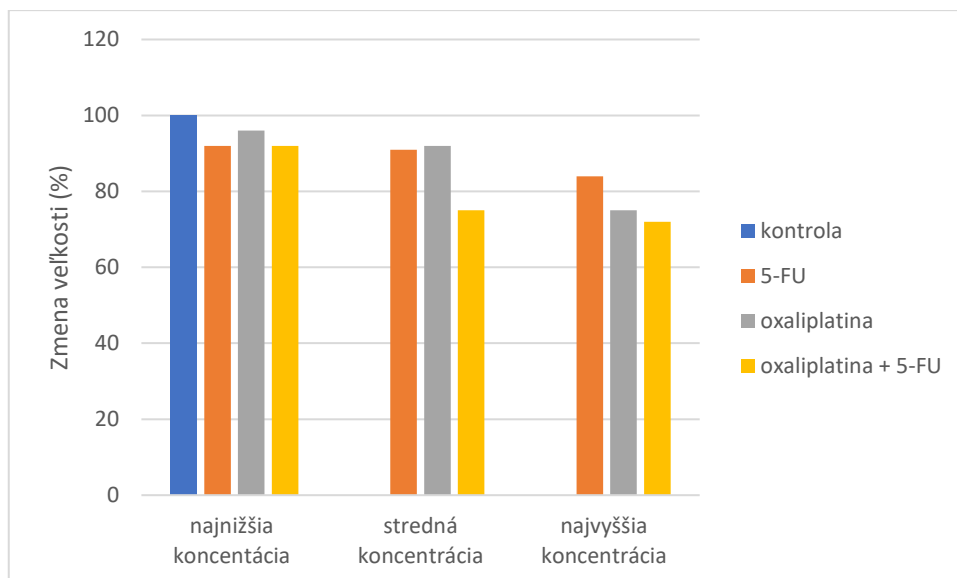
Multielulárne sféroidy boli vytvorené z 10 000 HT-29 buniek v 96-jamkovej platni s jamkami upravenými 1,5% agarózou podľa postupu 4.4.4. Po 72 hod. boli sféroidy ovplyvnené cytotoxickými látkami, 5-fluorouracilom o koncentráciách 10 mM, 1 mM a 0,1 mM; oxaliplatinou o koncentráciách 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M a zmesou týchto dvoch látok o koncentráciách 10mM 5-fluorouracil + 100 μ M oxaliplatina, 1mM 5-fluorouracil + 10 μ M oxaliplatina a 0,1 mM 5-fluorouracil + 1 μ M oxaliplatina. Po 3 dňoch boli sféroidy vyfotené pomocou mikroskopu s kamerou za použitia softvéru cellSense Entry. Veľkosť sféroidov bola hodnotená pomocou softvéru ImageJ.

Pôsobením cytotoxických látok na sféroidy prišlo k narušeniu ich integrity, na okrajoch sa začínali rozpadat', znižovala sa ich veľkosť (Obr. č. 8). Pôsobením zmesi 5-fluorouracilu a oxaliplatiny s najvyššími koncentraciami prišlo k zmešeniu sféroidov na 72% oproti kontrolnej vzorke, ich veľkosť bola 729 μ m. Veľkosť kontrolnej vzorky bola 1018 μ m. Pôsobením zmesi 5-fluorouracilu a oxaliplatiny so strednou koncentraciou nastalo zmenšenie sféroidov na 75% oproti kontrolnej vzorke, veľkosť bola 766 μ m, pri najnižšej koncentrácii nastalo zmenšenie sféroidov na 92% pôvodnej hodnoty, veľkosť bola 933 μ m. Pôsobením oxaliplatiny o najvyššej koncentrácii prišlo ku zmenšeniu na 75% oproti kontrolnej vzorke, veľkosť bola 765 μ m. Vplyvom strednej koncentrácie sa sféroidy zmenšili na 91% oproti kontrolnej vzorke, veľkosť bola 933 μ m.

Pri najnižšej koncentrácii nastalo zmenšenie na 96% oproti kontrolnej vzorke, veľkosť bola 978 μm . Vplyvom najvyššej koncentrácie 5-fluorouracilu nastalo zmenšenie sféroidov na 84% oproti kontrolnej vzorke, veľkosť bola 858 μm , pri strednej koncentrácii nastalo zmešenie na 91% oproti kontrolnej vzorke, veľkosť bola 928 μm a pri najnižšej koncentrácii nastalo zmenšenie na 92% oproti kontrolnej vzorke, veľkosť bola 940 μm (Obr. č. 9).



Obr. č. 8: Vplyv cytotoxických látok na multicelulárne sféroidy, v poslednom stĺpci je zobrazená kontrola a v riadkoch je zobrazený vplyv cytostatík, kde zľava do prava klesá koncentrácia. V poslednom riadku je zobrazený vplyv zmesi oboch použitých látok v koncentráciách: 10mM 5-FU + 100 μM oxaliplatina, 1mM 5-FU + 10 μM oxaliplatina a 0,1 mM 5-FU + 1 μM oxaliplatina. Vplyv cytostatík na sféroidy bol dokumentovaný pomocou mikroskopu (Leika) s kamerou DP73 (Olympus) s použitím softvéru cellSens Entry pri 100x zväčšení.



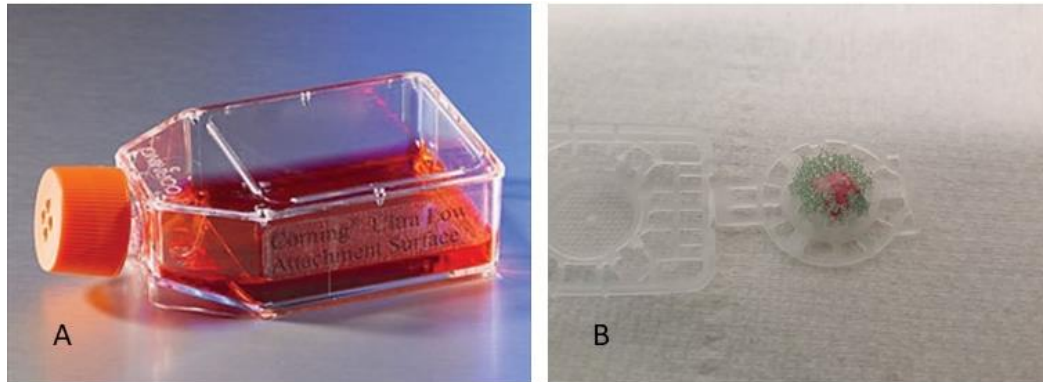
Obr. č. 9: Hodnotenie zmeny veľkosti multicelulárnych sféroidov bunkovej línie HT-29 vplyvom cytotoxických látok 5-fluorouracilu, oxaliplatiny a ich zmesi. Experiment bol vykonaný raz, sféroidy boli v 6 replikátoch, avšak v grafe sú uvedené výsledky z jedného replikátu, pretože zvyšné replikáty boli zaliate do parafínu.

5.3 Formalínová fixácia sféroidov a zaliatie do parafínu pre imunohistochemickú analýzu

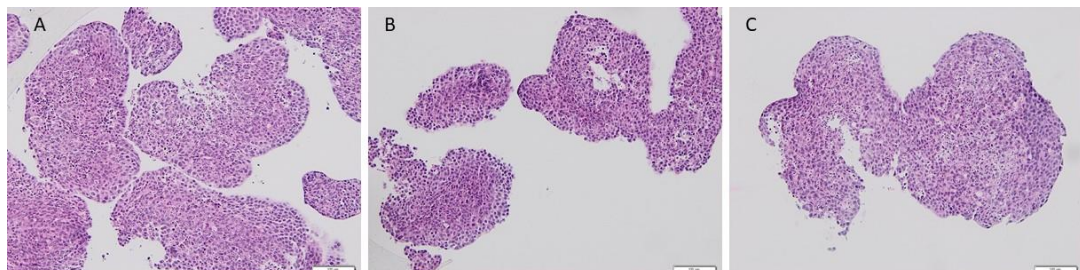
Prenesenie cytotoxicky ovplyvnených sféroidov z 96 jamkovej platne na terčík kazety pre prípravu parafínového bloku bolo neúspešné. Neúspech mohol byť zapríčinený narušenou stabilitou sféroidov vplyvom cytotoxických látok. Tento experiment bude v budúcnosti opakovaný, s cieľom nafarbiť na sféroidoch znaky proliferácie (Ki-67) a apoptózy (cPARP) pre lepšie zhodnotenie cytotoxického účinku použitých látok. Prenos takýchto sféroidov plánujeme uskutočniť pomocou zaliata sféroidov do agarózy priamo v 96 jamkovej doske, z ktorej budú vylúpnuté a vložené na terčík.

Bunky HT-29 boli kultivované aj vo väčších 3D sféroidoch v „low-attachment“ kultivačných nádobách (Obr. č. 10A) pre optimalizáciu prípravy rezov pre imunohistochemickú analýzu. Sféroidy kultivované podľa postupu 4.4.3 boli následne prenesené na terčík kazety pre prípravu parafínového bloku. Prenesenie sféroidov na terčík (Obr. č. 10B) bolo uskutočnené tromi spôsobmi: (A) najväčšie sféroidy boli vybraté pomocou laboratórnej lyžičky priamo z „low attachment“ kultivačnej nádoby. (B) bol vytvorený pelet centrifugáciou sféroidov. (C) sféroidy boli imobilizované v trombínovej zrazenine vytvorenej podľa postupu 4.4.7. Sféroidy

v kazete boli fixované vo formalíne a zaliate do parafínu. Rezy tenké 5 μm boli histochemicky farbené hematoxylínom (Obr. č. 11) a potom aj imunohistochemicky s protilátkami proti CK20 a CDX2 proteínom (Obr. č. 12).



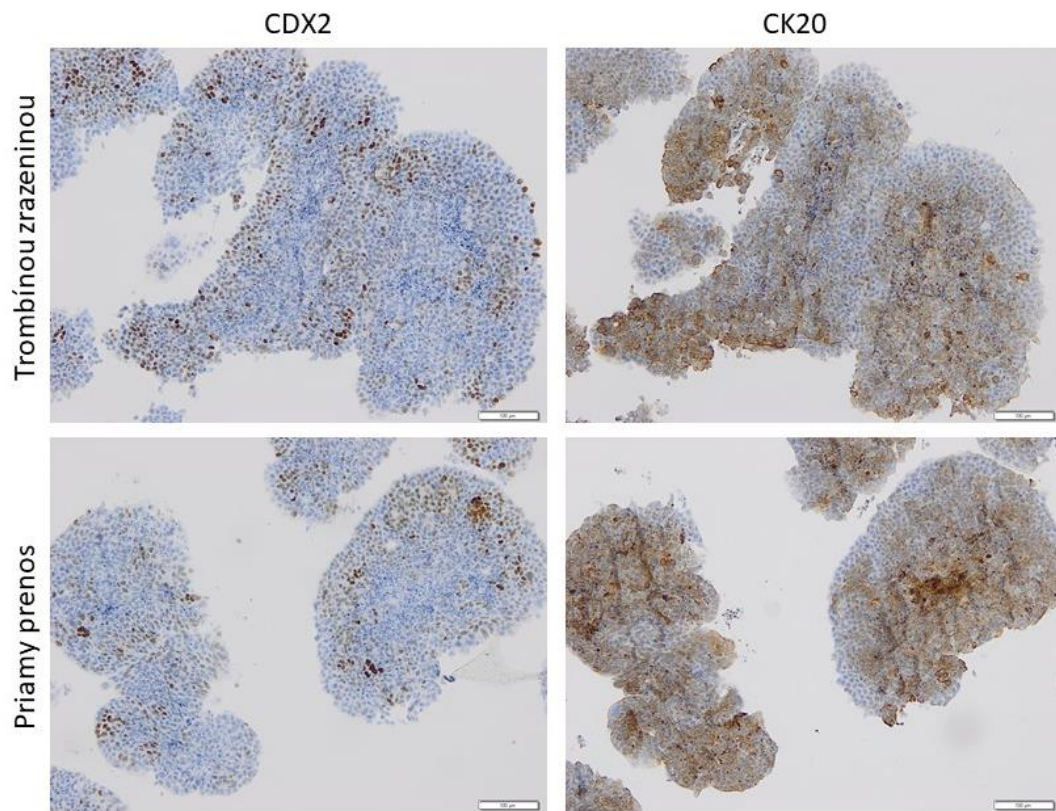
Obr. č. 10: Pomôcky pre kultiváciu 3D modelov a ich zaliate do parafínu (A) „low attachment“ kultivačná nádoba na kultiváciu sféroidov (prevzaté z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/>) (B) terčik s eozínom zafarbenou trombínovou zrazeninou.



Obr. č. 11: Hematoxylínom vizualizované multicelulárne sféroidy, ktoré boli prenesené na terčik tromi spôsobmi. (A) najväčšie sféroidy boli vybraté pomocou laboratórnej lyžičky priamo z „low attachment“ kultivačnej nádoby. (B) bol vytvorený pelet centrifugáciou sféroidov. (C) sféroidy boli imobilizované v trombínovej zrazenine vytvorenej podľa postupu 4.4.7. Sféroidy v kazete boli fixované vo formalíne a zaliate do parafínu. Snímky sú fotené pri 100x zväčšení pomocou mikroskopom BX43 (Olympus) s kamerou U-CMAD3 (Olympus) s použitím softvéru cellSens Dimension.

Snímky hematoxylínom farbených multicelulárnych sféroidov (Obr. č. 11) preukazujú, že nie je rozdiel v spôsobe prenosu. Nie je teda potrebné sféroidy predom imobilizovať pomocou trombínovej zrazeniny aby bunky zostali stabilné počas procesu zaliatia do parafínu. Snímky imunohistochemického farbenia sféroidov protilátkami

proti CDX2 a CK20 proteínom vykazujú pozitivitu u oboch použitých protilátok (Obr. č. 12).

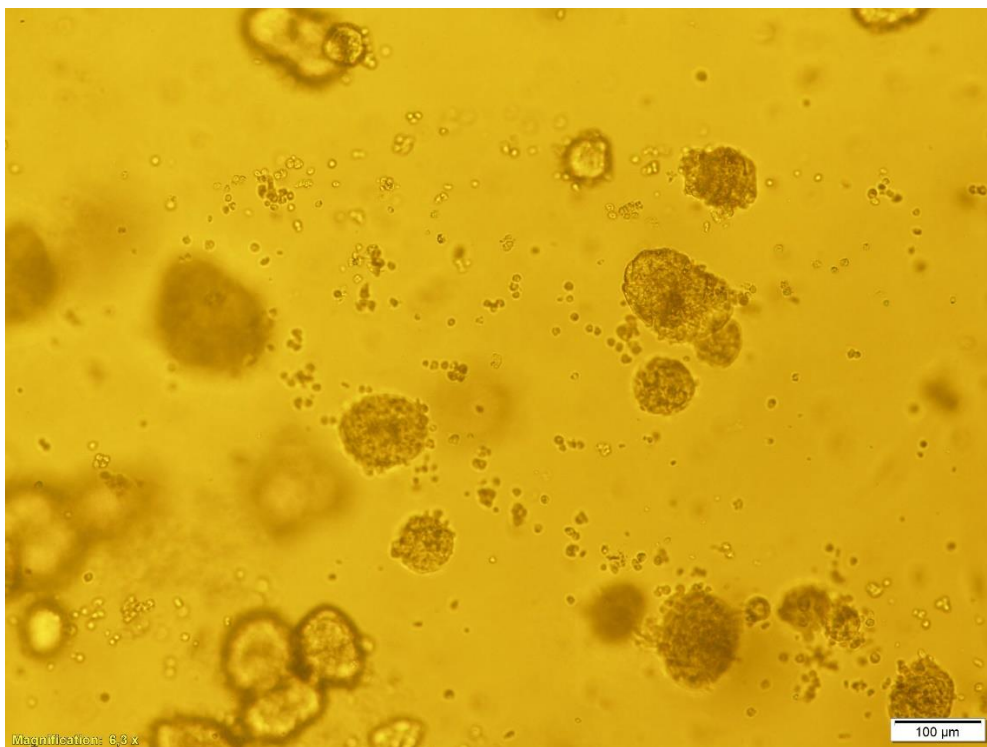


Obr. č. 12: Imunohistochemická analýza parafinom fixovaných rezov sféroidov farbených protilátkami CK20 a CDX2. Horná dvojica obrázkov predstavuje sféroidy zaliate do parafínu formou trombínovej zrazeniny. Dolná dvojica obrázkov predstavuje sféroidy, ktoré boli prenesené na terčik kazety pre zaliatie do parafínu priamo z „low attachmet“ kultivačnej nádoby. Dvojica obrázkov vľavo sú sféroidy farbené protilátkami proti CDX2 proteínom. Dvojica obrázkov vpravo sú sféroidy farbené protilátkami proti CK20 proteínom. Snímky sú fotené pri 10x zväčšení mikroskopom BX43 (Olympus) s kamerou U-CMAD3 (Olympus) s použitím softvéru cellSens Dimension.

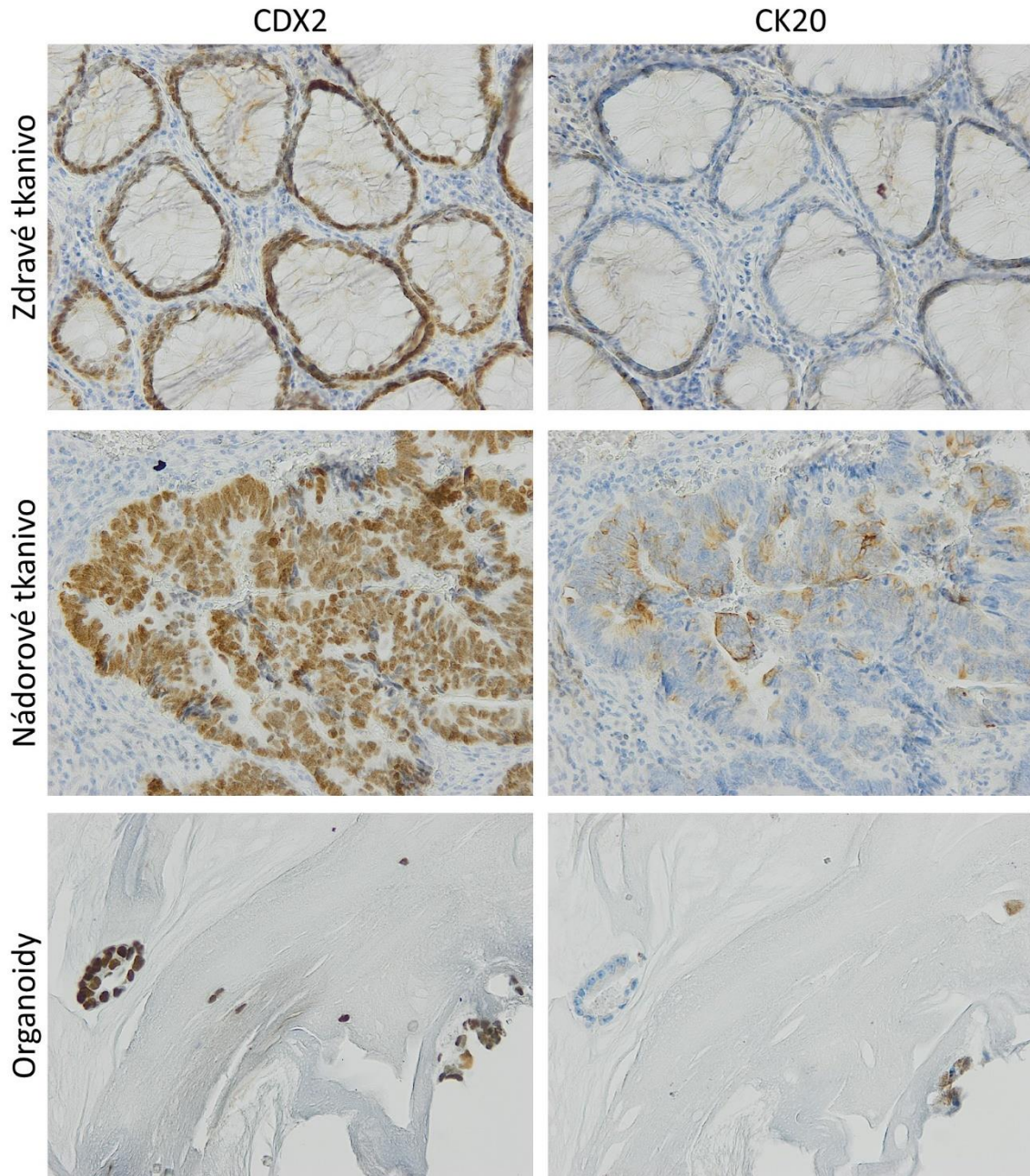
5.4 Imunohistochemická analýza organoidov a tkanív

Imunohistochemicky analyzované boli organoidy odvodené od patientských nádorov, ktoré boli kultivované v matrigéli (Obr. č. 13) spolu so špecifickým CRC médiom a pasážované podľa postupu 4.4.6 (táto kultivácia bola vykonávaná v spolupráci s Mgr. Levkovou, ktorá je zodpovedná za tkanivovú biobanku na Ústave klinickej a molekulárnej patológie LF UP). Organoidy boli následne zaliate do parafínu v podobe

trombínových zrazenín podľa postupu 4.4.7. Spolu s organoidmi boli farbené i tkanivové rezy pôvodnej patientskej vzorky. Proces imunohistochemického farbenia bol vykonaný podľa postupu 4.4.8. Na samotné imunohistochemické farbenie boli zvolené protilátky proti CK20 a CDX2 proteínom, ktoré sú špecifické pre bunky nádorov hrubého čreva. Tkanivové rezy pochádzajúce z pôvodného tkaniva pacienta vykazovali pozitívitu u oboch použitých protilátok (Obr. č. 14), pričom CDX2 (sústredený v bunkových jadrách) bol intenzívnejšie a homogénnejšie zafarbený, narozdiel od CK20 (sústredený skôr v cytoplazme buniek), ktorý bol prítomný iba v niektorých bunkách. Farbenie CDX2 bolo prítomné aj vo všetkých bunkách normálneho tkaniva aj pri 3D kultivácii.



Obr. č. 13: Organoidy odvodené od pacientov kultivované v matrigéli, fotené pri 100x zväčšení pomocou mikroskopu (Leika) s kamerou DP73 (Olympus) s použitím softvéru cellSens Entry.



Obr. č. 14: Imunohistochemická analýza formalín-fixovaných rezov tkanív a organoidov. Horná dvojica snímkov zobrazuje imunohistochemicky farbené zdravé tkanivo a dvojica snímkov v strede zobrazuje imunohistochemicky farbené rezy nádorového tkaniva. Dolná dvojica snímkov zobrazuje imunohistochemicky farbené rezy organoidov. Na dvojici snímkov vľavo je farbený proteín CDX2 a na dvojici snímkov vpravo je farbený proteín CK20. Snímky sú foteňé pri 200x zväčšení mikroskopom BX43 (Olympus) s kamerou U-CMAD3 (Olympus) s použitím softvéru cellSens Dimension.

6 DISKUSIA

Naše výsledky hodnotenia vplyvu cytotoxicity na monokultúru HT-29 ukazujú, že najväčší účinok na bunky vykazovala zmes oboch použitých cytostatík (5-fluorouracilu v kombinácii s oxaliplatinou). Bunky ovplyvnené samotným 5-fluorouracilom vykazovali nižšiu citlivosť než bolo v prípade oxaliplatinu. Virgone-Carlotta a kol. (2017) vo svojej štúdií uvádzajú rovnako zníženú citlivosť na 5-FU pre bunkovú líniu HT-29 v porovnaní s bunkovými líniami HTC116 a SW48, taktiež odvodenými od CRC. Ďalej uvádzajú, že táto rezistencia môže byť spôsobená kohezívnymi vlastnosťami buniek HT-29. V práci sa taktiež uvádza, že 3D kultúry vykazujú väčšiu rezistenciu voči 5-FU v porovnaní s 2D kultúrami pri všetkých použitých bunkových línách. Rovnako zvýšená rezistencia voči chemoterapeutickým látkam v 3D kultúrach bola potvrdená v práci Galateanu a kol. (2016). V tejto práci porovnávali vplyv 5-FU, kyseliny folínovej a oxaliplatinu na 2D kultúru bunkovej línie HT-29 a 3D sféroidy. Ich údaje preukázali, že v 3D kultúre boli potrebné oveľa vyššie koncentrácie na usmrtenie polovice bunkovej populácie v porovnaní s 2D kultivačnými modelmi. V našej práci bol vplyv cytostatík na 2D kultúry hodnotený viabilitou buniek zatiaľ čo 3D kultúry boli vyhodnotené zmenšením veľkosti sféroidov oproti kontrolnej vzorke. Presné porovnanie 2D a 3D kultúry teda nie je možné vyhodnotiť, avšak kombinácia najvyšších koncentrácií cytostatík spôsobila iba 28% pokles veľkosti sféroidov, ale 47% pokles viability adherentných buniek. Hoffmann a kol. (2015) vo svojej práci prostredníctvom metabolickej aktivity analyzovali sféroidy odvodené od CRC s cieľom vyhodnotenia ich odpovede na 5-FU v kombinácii s oxaliplatinou alebo irinotekanom. Zistili, že sféroidy bunkovej línie Caco-2 sú citlivé na obe kombinácie štandardných chemoterapeutických látok, pričom vyššiu citlivosť vykazujú na 5-FU s oxaliplatinou. Sféroidy bunkovej línie DLD-1 a COLO 205 boli identifikované ako čiastočne citlivé, zatiaľ čo sféroidy bunkovej línie HT-29 a HCT-116 boli chemorezistentné voči obom zmesiam látok. Pri hodnotení cytotoxicity na multiceulárne sféroidy HT-29, sledovaním zmenšenia veľkosti a narušenia integrity okrajov, sme úplnú chemorezistenciu nepotvrdili. Vzhľadom na nejednoznačnosť chemorezistencie bunkovej línie HT-29 voči sledovaným cytotoxickým látkam, budeme experiment opakovať spolu s hodnotením proliferácie a apoptózy pomocou imunohistochemického farbenia sféroidov zaliatych do parafínu.

Napriek tomu, že 3D bunkové kultúry vykazujú vyššiu rezistenciu na chemoterapeutické látky oproti 2D bunkovým kultúram, môžu presnejšie predpovedať požadovanú dávku liečiva u pacientov. Zang a kol. (2016) v práci preukázali, že použitie 5-FU má vyššiu účinnosť pri usmrťovaní rakovinových buniek hrubého čreva v 3D mnohobunkových modeloch ako gemcitabín. Čo súhlasí aj s klinickými výsledkami ukazujúcimi nízku účinnosť gemcitabínu oproti 5-FU v liečbe rakoviny hrubého čreva. Naproti tomu bunky HT-29 v 2D kultúre nesprávne naznačovali, že gemcitabín je účinnejší v liečbe rakoviny hrubého čreva ako 5-FU. Podobnosť progresie bunkového cyklu v 3D kultúrach s ľudským tkanivom bola v práci Zang a kol. (2016) dokázaná imunohistochemickým farbením biomarkerov Ki-67 (antigén prítomný v proliferujúcich bunkách) a p27^{Kip1} (inhibítor cyklín-dependentných kináz, ktorý môže indukovať zastavenie rastu, diferenciáciu a apoptózu). Imunohistochemická analýza týchto znakov v 3D kultúrach potvrdzuje, že sféroidy nepozostávajú iba z proliferujúcich buniek, ale i z quiescentných buniek, podobné ako je to i v *in vivo* nádoroch.

Definícia organoidov a sféroidov je v literatúre nejednoznačná. V našej práci sú ako organoidy považované 3D bunkové kultúry odvodené od patientských vzoriek a kultivované v matrici (napr. Matrigél), zatiaľ čo sféroidy sú 3D kultúry odvodené od immortalizovaných bunkových línií (HT-29) a kultivované voľne v médiu v špecifických nádobách, modifikovaných tak, aby sa zabránilo prisadnutiu buniek na povrch. Pre lepšie zhodnotenie 3D modelov je vhodné ich zaliatie do parafínu, ktoré umožňuje imunohistochemickú analýzu vybraných proteínov, ako aj sledovať vzájomné interakcie medzi bunkami. Tieto vzorky môžu byť veľmi malé, a preto sme použili tzv. terčíkové kazety, ktoré sú v patologickej praxi využívané pre zaliatie minimálnych tkanivových vzoriek. Príprava rezov je následne efektívna, pretože vzorka je prítomná iba v úzkej oblasti parafínového bloku. Pre lepšiu orientáciu pri krájaní na mikrotome je vzorka pred zaliatím zafarbená eozínom. V našej práci sme porovnali tri spôsoby prenosu multicelulárnych sféroidov: (A) najväčšie sféroidy boli vybraté pomocou laboratórnej lyžičky priamo z „low attachment“ kultivačnej nádoby, (B) bol vytvorený pelet centrifugáciou sféroidov, (C) sféroidy boli imobilizované v trombínovej zrazenine na terčík kazety pre prípravu parafínového bloku. Histochemické farbenie bolo porovnateľné a bunky teda nie je potrebné predom imobilizovať v trombínovej zrazenine. Imunohistochemickým farbením CK20 a CDX2 biomarkerov sme preukázali, že sféroidy vykazujú vlastnosti kolonového tkaniva.

Avšak pri porovnaní zafarbených vzoriek sféroidov a organoidov odvodených z patientských tkanív je vidieť, že v parafínových bločkoch organoidov je nižší počet buniek. To mohlo byť zapríčinené použitou technikou zaliatia organoidov do parafínových blokov. Táto technika pozostáva z prvotného natrávenia matrigélu prostredníctvom dispázy, čo mohlo viesť k narušeniu štruktúr organoidov. Túto techniku je možné zdokonaľiť zaliatím celých organoidov do parafínu vrátane matrice, čo by mohlo poskytnúť imunohistochemické snímky s väčším počtom buniek. I napriek menšiemu počtu buniek v parafínových rezoch organoidov sme pozorovali pozitivitu u oboch sledovaných biomarkerov, čím môžeme potvrdiť zachovanie vlastností pôvodného kolonového tkaniva v kultúre. Homogénne farbenie bolo pozorované predovšetkým pre proteín CDX2. Schopnosť zachovania vlastností kolónového tkaniva u organoidov odvodených od pacientov potvrdili v práci Engel a kol. (2020), kde porovnávali expresiu CDX2 v primárnom nádore a organoidoch odvodených od primárnych nádorov nukleárnym farbením. Pozorovali pozitivitu u CDX2 u všetkých primárnych nádoroch rovnako ako i u organoidoch, čím potvrdili, že sa v kultúre udržuje pôvod črevných adenokarcinómov. Rovnako zachovanie vlastností pôvodného tkaniva potvrdili i Yao a kol. (2020) analýzou expresie Ki-67, CDX2, β -katenín, CK20 a pan-cytokeratínov. Pre výber účinnej terapie v rámci personalizovanej medicíny bude potrebné otestovať patientské organoidy aj na prítomnosť nádorových markerov. Organoidy si musia zachovať rovnaký genetický aj expresný profil ako nádorové tkanivo.

Získané výsledky naznačujú, že v porovnaní so štandardnou 2D kultiváciou sú 3D modely vhodnejšie pre štúdium bunkovej odpovede na chemoterapeutické látky. Komplexnejší obraz buniek v primárnych nádoroch poskytujú organoidy odvodené od pacientov, čím sa stávajú relevantnejšími *in vitro* modelmi pre štúdium heterogenity bunkovej populácie. Tieto 3D modely môžu byť využité pre testovanie nových protinádorových liečiv, ako aj pre výber vhodnej terapie pacientov s pokročilým ochorením.

7 ZÁVER

Bakalárska práca sa zaoberala porovnaním 2D a 3D kultivácií bunkových modelov kolorektálnemu karcinómu ako aj analýzou patientských vzoriek v rámci personalizovanej medicíny. V práci sme sa bližšie venovali i organoidom odvodených od patientských vzoriek a ich možnému prínosu v personalizovanej medicíne.

Prvým z cieľov bolo spracovanie literárnej rešerše študovanej témy, kde sme sa zaoberali metódami použiteľnými v rámci personalizovanej medicíny. Bližšie sme sa zamerali na imunohistochemické metódy, ktoré sme používali v praktickej časti. V ďalšej časti literárneho prehľadu sme sa venovali problematike kolorektálneho karcinómu, jeho diagnostike a liečbe, ktorá napriek neustálemu pokroku nie je dostatočujúca. V poslednom rade spracovania literárneho prehľadu sme sa venovali spôsobom kultivácie buniek, najmä konvenčným 2D bunkovým kultúram v porovnaní s 3D modelmi. V rámci tejto kapitoly sme sa venovali i problematike organoidov, ktoré by mohli byť chýbajúcou časťou *in vitro* kultivačných modelov pre štúdium chorôb ako aj pre výber vhodnej terapie pre jednotlivých pacientov.

V praktickej časti sme sa v prvej fáze venovali kultivácii 2D a 3D bunkových kultúr odvodených od kolorektálneho karcinómu. Konkrétne sme pracovali s bunkovou líniou HT-29 a chemoterapeutickými látkami, bežne používanými pri liečbe kolorektálneho karcinómu. Tieto bunky boli v 2D kultúre ovplyvnené 5-fluorouracilom (o koncentráciách 10 mM, 1 mM a 0,01 mM), oxaliplatinom (o koncentráciách 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M) a ich zmesou. Ďalej sme sa zamerali na vytváranie multicelulárnych sféroidov z buniek línie HT-29. Sféroidy boli kultivované v 96-jamkovej doske, ktorej povrch bol ošetrený agarózou. Tieto sféroidy boli následne vystavené cytotoxickému účinku chemoterapeutík 5-fluorouracilu, oxaliplatiny a ich zmesou o rovnakých koncentráciách ako boli použité pri 2D kultúrach. Na vytvorenie 3D kultúr sféroidov boli taktiež použité „low attachment“ nádoby s prispôbeným povrchom, aby sa zabránilo bunkám sadnúť na dno kultivačnej nádoby. Takto kultivované sféroidy boli použitím rôznych spôsobov prenášané na terčik kazety pre zaliatie do parafínu. Najskôr boli parafínové rezy sféroidov farbené hematoxylínom pre hodnotenie metód prenosu sféroidov na terčik a následne boli imunohistochemicky sledované proteiny CK20 a CDX2, markery kolónového nádorového tkaniva.

Ďalším cieľom bola disociácia tkanív a kultivácia organoidov v Matrigéli (tento bod praktickej časti bol vykonaný v spolupráci s Mgr. Levkovou, ktorá je zodpovedná za tkanivovú biobanku na Ústave klinickej a molekulárnej patológie LF UP). Organoidy boli následne zaliete do parafínu a spolu s pôvodným patientským tkanivom boli imunohistochemicky sledované biomarkery CK20 a CDX2.

Výsledky našich experimentov potvrdili, že v 3D kultúrach sú zachované vlastnosti pôvodného kolonového tkaniva. Hoci bol potvrdený význam 3D kultúr v štúdiu protinádorových liekov, pre výber liečby pre daného pacienta, bude vhodné v organoidoch overiť expresiu alebo mutácie nádorových markerov aby bolo potvrdené zachovanie genetického profilu primárneho nádoru.

8 LITERATÚRA

Aboukheyr Es H, Montazeri L, Aref AR, Vosough M, Baharvand H. (2018): Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends in Biotechnology* 36: 358-371.

Aghabozorgi SA, Bahreyni A, Soleimani A, Bahrami A, Khazaei M, Ferns GA, Avan A, Hassanian M (2019): Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. *Biochimie* 157: 64-71.

Calvert PM, Frucht H. (2002): The genetics of colorectal cancer. *American College of Physicians-American Society of Internal Medicine* 137: 603-612.

Clevers H. (2016): Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165: 1586-1597.

DeHaan RK, Sarvestani SK, Huang EH (2020): Organoid Models of Colorectal Pathology: Do They Hold the Key to Personalized Medicine? A Systematic Review. *Dis Colon Rectum* 63: 1559-1569.

Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardon F, Vermorken JB. (2010): A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *The Oncologist* 15: 699-731.

Dixon AR, Bathany C, Tsuei M, White J, Barald KF, Takayama S. (2015): Recent developments in multiplexing techniques for immunohistochemistry. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 15 (9): 1171-86.

Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. (2017): Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32: 266-277.

Engel RM, Chan WH, Nickless D, Hlavca S, Richards E, Kerr G, Oliva K, McMurrick PJ, Jardé T, Abud HE. (2020): Patient-Derived Colorectal Cancer Organoids Upregulate

Revival Stem Cell Marker Genes following Chemotherapeutic Treatment. *Journal of Clinical Medicine* 128.

Fitzgerald KA, Malhotra M, Curtin CM, O'Brien FJ, O'Driscoll CM. (2015): Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *Journal of Control Release* 215: 39-54.

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. (2012): Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* 3: 153-173.

Fujii M, Sato T. (2020): Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. *Nature materials* 20: 156-169.

Galateanu B, Hudita A, Negrei C, Ion RM, Costache M, Stan M, Nikitovic D, Hayes AW, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Ginghina O. (2016): Impact of multicellular tumor spheroids as an *in vivo*-like tumor model on anticancer drug response. *International journal of oncology* 48: 2295-2302.

Grady WM, Markowitz SD. (2014): The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Digestive Diseases and Sciences*: 762-72.

Hassan G, Afify SM, Kitano S, Seno A, Ishii H, Shang Y, Matsusaki M, Seno M (2021): Cancer stem cell microenvironment models with biomaterial scaffolds *in vitro*. *Processes* 9 (1): 45.

Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. (2018): Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences* 181.

Hoffmann OI, Ilmberger C, Magosch S, Joka M, Jauch KW, Mayer B. (2015): Impact of the spheroid model complexity on drug response. *Journal of Biotechnology* 205: 14-23.

Hofman P, Badoual C, Henderson F, Berland L, Hamila M, Long-Mira E, Lassalle S, Roussel H, Hofman V, Tartour E, Ilić M. (2019): Multiplexed Immunohistochemistry for Molecular and Immune Profiling in Lung Cancer-Just About Ready for Prime-Time?. *Cancers* 11, 283.

Hoggatt J. (2011): Personalized medicine--trends in molecular diagnostics: exponential growth expected in the next ten years. *Molecular Diagnostic Therapy* 15 (1): 53-55.

Hong SN. (2018): Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intestinal Research* 16: 327-337.

Hynds RE, Giangreco A. (2013): Concise review: the relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. *Stem Cells* 31: 417-22.

Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. (2017): Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Science* 108: 283-289.

Jackson SE, Chester JD. (2014): Personalised cancer medicine. *International Journal of Cancer* 137: 262-266.

Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. (2016): 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* 4: 910-919.

Kastrinos F, Syngal S. (2011): Inherited colorectal cancer syndromes. *Cancer Journal* 17 (6): 405-15.

Kim SW, Roh J, Park CS. (2016): Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine* 50: 411-418.

Knight E, Przyborski S. (2014): Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created *in vitro* . Journal of Anatomy: 746-56.

Krzyszczyk P, Acevedo A, Davidoff EJ, Timmins LM, Marrero-Berrios I, Patel M, White C, Lowe C, Sherba JJ, Hartmanshenn C, O'Neill KM, Balter ML, Fritz ZR, Androulakis IP, Schloss RS, Yarmush ML. (2018): The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. Technology 6: 79-100.

Lao VV, Grady WM. (2011): Epigenetics and colorectal cancer. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 8: 686-700.

Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW. (2016): Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. World Journal of Gastroenterology 22 (5): 1745-55.

Lin JR, Izar B, Wang S, Yapp C, Mei S, Shah PM, Santagata S, Sorger PK. (2018): Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. Elife 7, e31657.

Malone ER, Oliva M, Sabatini PJB, Stockley TL, Siu LL. (2020): Molecular profiling for precision cancer therapies. Genome Medicine 12:8.

Marley AR, Nan H. (2016): Epidemiology of colorectal cancer. International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics 7: 105-114.

Martini G, Troiani T, Cardone C, Vitiello P, Sforza V, Ciardiello D, Napolitano S, Della Corte CM, Morgillo F, Raucci A, Cuomo A, Selvaggi F, Ciardiello F, Martinelli E. (2017): Present and future of metastatic colorectal cancer treatment: A review of new candidate targets. World Journal of Gastroenterology 23: 4675-4688.

Matos LL, Trufelli DC, de Matos MG, da Silva Pinhal MA. (2010): Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. Biomarker Insights 5: 9-20.

McCourt CM, Boyle D, James J, Salto-Tellez M. (2013): Immunohistochemistry in the era of personalised medicine. *Journal of Clinical Pathology* 66: 58-61.

Meyerhardt JA, Mayer RJ. (2005): Systemic therapy for colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine* 352: 476-87.

Nagle PW, Plukker JTM, Muijs CT, van Luijk P, Coppes RP. (2018): Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. *Seminars in Cancer Biology* 53: 258-264.

O'Hurley G, Sjöstedt E, Rahman A, Li B, Kampf C, Pontén F, Gallagher WM, Lindskog C. (2014): Garbage in, garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Molecular Oncology* 8: 783-98.

Oh HH, Joo YE. (2020): Novel biomarkers for the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Intestinal Research* 18 (2): 168-183.

Piawah S, Venook AP. (2019): Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer*: 4139-4147.

Prabhu RH, Patravale VB, Joshi MD. (2015) Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *International Journal of Nanomedicine* 10: 1001-1018.

Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Paul Solomon FD (2014): 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of Cellular Physiology* 230: 16-26.

Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. (2019): Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny* 14 (2): 89-103.

Schacht V, Kern JS. (2015): Basics of immunohistochemistry. *Journal of Investigative Dermatology* 135: 1-4.

Schutgens F, Clevers H. (2020): Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. *Annual Review of Pathology* 15: 211-234.

Simon K. (2016): Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging* 11: 967-976.

Souza AG, Silva IBB, Campos-Fernandez E, Barcelos LS, Souza JB, Marangoni K, Goulart LR, Alonso-Goulart V. (2018): Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Current Pharmaceutical Design* 24: 1689-1694.

Stack EC, Wang C, Roman KA, Hoyt CC. (2014): Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* 70: 46-58.

Stintzing S. (2014): Management of colorectal cancer. *F1000Prime Reports* 6:108.

Sukswai N, Khoury JD.(2019): Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Current Hematology Malignancy Reports* 14: 368-375.

Tan C, Du X. (2012): KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 18: 5171-80.

Taube JM, Akturk G, Angelo M, Engle EL, Gnjatic S, Greenbaum S, Greenwald NF, Hedvat CV, Hollmann TJ, Juco J, Parra ER, Rebelatto MC, Rimm DL, Rodriguez-Canales J, Schalper KA, Stack EC, Ferreira CS, Korski K, Lako A, Rodig SJ, Schenck E, Steele KE, Surace MJ, Tetzlaff MT, von Loga K, Wistuba II, Bifulco CB (2020): The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *Journal for Immuno Therapy of Cancer* 8.

Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. (2014): 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 69-70: 29-41.

Virgone-Carlotta A, Lemasson M, Mertani HC, Diaz JJ, Monnier S, Dehoux T, Delanoë-Ayari H, Rivière C, Rieu JP. (2017): In-depth phenotypic characterization of multicellular tumor spheroids: Effects of 5-Fluorouracil. *Plos One* 12.

Wang Z, Liu X, Ho RL, Lam CW, Chow MS. (2016): Precision or Personalized Medicine for Cancer Chemotherapy: Is there a Role for Herbal Medicine. *Molecules* 21, 889.

Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. (2015): Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17: 1-15.

Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. (2003): CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology* 27: 303-10.

Wolpin BM, Meyerhardt JA, Mamon HJ, Mayer RJ. (2007): Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA: Cancer Journal for Clinicians* 57: 168-85.

Wrobel P, Ahmed S. (2019): Current status of immunotherapy in metastatic colorectal cancer. *International Journal of Colorectal Disease* 34: 13-25.

Yao Y, Xu X, Yang L, Clevers H, Zhang Z, Hua G. (2020): Patient-derived organoids predict chemoradiation responses of locally advanced rectal cancer. *CellPress* 26: 17-26.

Zang R, Zhang X, Sun J, Yang ST. (2016): *in vitro* 3-D multicellular models for cytotoxicity assay and drug screening. *Process biochemistry* 51: 772-780.