

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Stanovení toxicity pomocí 3D sféroidů

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Štěpánka Kozáková

Obor studia: Výživa a potraviny, N-NUTRIM

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení toxicity pomocí 3D sféroidů" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.04.2021

Poděkování

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) Ing. Ivu Doskočilovi, Ph.D. za odborné vedení, rady, informace, připomínky, trpělivost a vstřícnost při konzultacích, které mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Mé poděkování patří též mému přítelovi a rodině, kteří mi byli oporou.

Stanovení toxicity pomocí 3D sféroidů

Souhrn

Přes veškerá varování je v současné době velmi rozšířen „špatný“ životní styl. Hlavní rysy jsou zejména špatné stravovací návyky, kouření, požívání alkoholu, zbytky chemických látek. Dále lidé často trpí stresem, tomuto a dalším agens, kterým je populace vystavována. Dochází k vyšší pravděpodobnosti vzniku nádorového onemocnění, které se tak řadí mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí na světě. Léčba nádorového onemocnění spočívá převážně v chirurgických zákrocích v kombinaci s radioterapií či chemoterapií, které se stále zdokonalují. Přesto není pokrok ve vývoji léků a v léčebných přístupech úměrný k léčbě nádorového onemocnění. Z tohoto důvodu se začaly používat tzv. 3D modely v podobě organoidů nebo sféroidů, které oproti nejrozšířenějším 2D modelům dokážou lépe napodobit podmínky v lidském těle.

Cílem této diplomové práce bylo sestavit kompaktní sféroidy z buněčných linií kolorektálních adenokarcinomů HT29 a Caco-2. A otestovat je také pomocí klasické 2D metody využívající tetrabromid. Na vytvoření sféroidů bylo izolováno pro každou jamku 1000 buněk na 100 μl dané buněčné linie. Takto byla destička centrifugována po dobu 5 minut a 400 otáček. Následně byla destička inkubována 72h v CO_2 inkubátoru s 5 % CO_2 . Poté byla pořízena série fotek a byly přidány testované alkaloidy lykorin, heamanthamin, heamanthidin, montanin v koncentraci 5 – 0,625 μM a vinorelbin (0,07 – 0,009 μM) jako standard. Destička byla nechána v inkubaci 48h a opět změřena, následně bylo odebráno staré medium a nahrazeno novým, které opět obsahovalo testované látky v daných koncentracích. Toto se opakovalo po dobu 10 dní. Získané fotografie byly analyzovány pomocí programu ImigiJ a získaná data byla vyhodnocena v programu GrahpadPrism.

Získané výsledky ukázaly, že lykorin (IC_{50} 2,34 \pm 0,41) přesto, že vykazoval jednu z nejnižších hodnot IC_{50} , nemá výraznou schopnost inhibovat růst sféroidu při nejnižší koncentraci 0,625 μM . Naproti tomu u heamanthaminu, u kterého hodnota IC_{50} byla poměrně vysoká (IC_{50} 4,84 \pm 0,29), byla schopnost prostupovat a zpomalovat růst sféroidu i při koncentraci 0,625 μM o 40 %. Dále montanin byl při dané koncentraci schopný výrazně zpomalit růst sféroidů, a to o 20 %. U vinorelbinu byl zaznamenán u koncentrací 0,07; 0,039; 0,019 μM rozpad sféroidu ve druhém potažmo čtvrtém dnu působení daných koncentrací. U koncentrace 0,009 μM byl zaznamenán v osmém až desátém dnu trend začínajícího rozpadu sféroidu a uvolňování jednotlivých buněk.

Při porovnání získaných výsledků 2D a 3D modelů je patrný výrazný rozdíl mezi tím, které látky jsou skutečně funkční a mají schopnost ovlivňovat buněčný růst ve vícero vrstvách. Je zde předpoklad, že při dlouhodobějším vystavení testovaných látek by mohl být růst výraznější, případně úprava chemické struktury testovaných alkaloidů by mohla vést ke zvýšení jejich účinnosti v zastavení buněčného růstu.

Klíčová slova: 3D sféroid, buněčné linie, toxicita, Caco-2, HT29, alkaloidy *Amaryllidaceae*.

Determination of toxicity using 3D spheroids

Summary

Despite all the obvious warnings, "bad" lifestyle is widely spread nowadays. The main features being poor eating habits, smoking, alcohol consumption or chemical residues. Furthermore, people often suffer from stress. These agents among many others to which the population is exposed, are more likely to contribute to the development of cancer, the second most common causes of death in the world. The treatment of cancer consists mainly of surgical procedures in combination with radiotherapy or chemotherapy, these are constantly being improved. Nevertheless, progress in medicine development and treatment approaches is disproportionate to the treatment of cancer. For this reason, the so-called 3D models in the form of organoids or spheroids have begun to be used. These 3D models which can, in contrast to the most spread 2D models, imitate the conditions in human body better.

The aim of this thesis is to assemble compact spheroids to form HT29 and Caco-2, and test them by implementing the basic 2D method using tetrabromide. For creating spheroids, 1000 cells per 100 μl of a given cell line were isolated each dimple. Therefore, the plate is centrifuged 300 times, each time for 5 minutes. After that, the plate is incubated for 72 h in a CO₂ incubator with 5 % CO₂. Subsequently, a series of photos were taken and the tested alkaloids lycorin, heamathine, heamathadine, montanine at a concentration of 5 - 0.625 μM and vinorelbine (0.07-0.009 μM) were added as a standard. The plate is then incubated for 48 hours and measured again, followed by removal of the old medium and its replacement by a new one, which again contained the test substances of defined concentrations. This is being repeated for 10 days. Obtained photographs are analyzed by using the ImigiJ program and data is evaluated in the GrahpadPrism program.

Retrieved results showed that lycorin (IC_{50} 2,34 \pm 0,41), although showing one of the lowest IC_{50} values, does not have a significant ability to inhibit spheroid growth at the lowest concentration 0,625 μM . On the contrary, for heamathine, which had a relatively high IC_{50} value (IC_{50} 4,84 \pm 0,29), the ability to permeate and retard spheroids growth was even at the concentration of 0.625 μM by 40 %. Montanin with defined concentration was able to significantly slow down the growth of spheroids by 20 %. Vinorelbine was observed with concentrations of 0.07; 0.039; 0.019 μM breakup of spheroid in the second and fourth day with defined concentrations. At concentration of 0.009 μM , trend of early spheroid breakup and release and release of individual cells was recorded on days 8 to 10.

When comparing the obtained results of 2D and 3D models is evident, a significant difference is evident in actual function and ability to influence cell growth in several layers for various substances. It is presumed, that prolongation of the exposure of tested substances could lead to more pronounced growth. Prospectively, a modification of the chemical structure of tested alkaloids could result in increase of their effectiveness in cell growth inhibition.

Keywords: 3D spheroids, cell lines, toxicity, Caco-2, HT29, alkaloids *Amaryllidaceae*.

Obsah

1	Úvod	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3	Literární rešerše.....	9
3.1	Nádorové onemocnění.....	9
3.1.1	Nádorové buňky.....	9
3.1.2	Nádorové markery.....	11
3.1.3	Karcinogeneze.....	14
3.1.4	Faktory ovlivňující nádorové onemocnění.....	17
3.1.5	Léčba nádorového onemocnění.....	21
3.1.6	Sféroidy.....	28
4	Metodika.....	33
4.1	Materiál.....	33
4.2	Metodika.....	33
4.2.1	Kultivace buněčných linií.....	33
4.2.2	Cytotoxicita (MTT).....	34
4.2.3	Příprava sféroidů.....	34
4.3	Statistické vyhodnocení.....	35
5	Výsledky.....	36
5.1	Cytotoxicita (MTT).....	36
5.2	Účinek alkaloidů čeledi <i>Amaryllidaceae</i> na sféroidy.....	36
6	Diskuze.....	41
7	Závěr.....	45
8	Literatura.....	46
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	55

1 Úvod

Celosvětově mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí patří nádorová onemocnění (Campbell et al. 2020). Velmi často je jejich vznik dáván do souvislosti se špatným životním stylem zahrnující nevhodnou skladbu stravy, kouření, stres ale také zbytky pesticidů a dalších (Ksouri 2019).

Léčba nádorového onemocnění velmi často spočívá v kombinaci chirurgického zákroku a chemoterapie. Na chemoterapii se používají farmaka na přírodním základu a je neustálá snaha hledat nové a účinnější léky na jednotlivé typy nádorového onemocnění (Arends et al. 2017).

Základní nejširší výběr probíhá na základě výsledků z testů provedených na buněčných liniích. Ve většině se jedná o 2D metody využívající buněčné monovrstvy stanovení hodnoty IC_{50} a nejčastěji se využívají metody, které sledují vliv testované látky na buněčné mitochondrie. Tyto výsledky jsou však velmi často nepřesné a neodpovídají podmínkám v lidském těle. Z tohoto důvodu se začaly používat 3D modely v podobě organoidů nebo sféroidů (Duval et al. 2017; Kapałczyńska et al. 2018).

Pomocí buněčných sféroidů jsme schopni sledovat schopnost testovaných látek prostupovat vícero vrstvami a zpomalit nebo případně zastavit růst vlastního sféroidu (Chatzinikolaidou 2016).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: V současné době slouží 3D buněčné modely k přesnějšímu stanovení účinků látek podobných *in vivo* podmínkám. S úpravou kultivačních podmínek pro založení 3D sféroidů je možné využívat rozdílné buněčné linie pro studium aktivity přírodních látek.

Cílem práce je využít nádorové a zdravé buňky střevního epitelu pro vytvoření 3D sféroidů. A to i těch buněčných linií, u kterých publikace doposud uvádějí, že netvoří 3D sféroidy.

3 Literární rešerše

3.1 Nádorové onemocnění

Celosvětově patří nádorová onemocnění mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí. Ročně zabijí více než 8 milionů lidí a předpokládá se, že v následujících desetiletích se úmrtnost zvýší o více jak 50 % (Campbell et al. 2020). A to i přesto, že současné způsoby léčby nádorových onemocnění spočívají v chirurgických zákrocích, radio terapii či chemoterapii, které se stále zdokonalují a sofistikuji. V současnosti je přesnější diagnostika přesněji specifikovat potřebu léčby dle specifických vlastností jednotlivých druhů nádorových onemocnění. Častou součástí léčby bývá sledování působení vnitřních a vnějších faktorů, aby léčba byla účinnější (Arends et al. 2017).

Na základě vnitřních a vnějších podnětů si tělo jako obranu vytváří záněty, které se přibližně 25 % podílí na rozvoji nádorového onemocnění (Murata 2018). Jako první v roce 1863 zaznamenal přítomnost leukocytů v neoplastických tkáních a vytvořil tak souvislost mezi zánětem a nádorovým onemocněním Rudolf Virchow. Souvislost mezi chronickým zánětem a nádorovým onemocněním je známa již relativně dlouho (Balkwill & Mantovani 2001). Hlavním cílem zánětu je eliminovat podněty, opravit poškozenou tkáň a obnovit homeostázu. V tomto případě se jedná o krátkodobé působení zánětu, který má léčebné následky. Pokud je však dlouhodobě udržován, hovoří se zde o chronickém zánětu, který má potenciál zvýšit a podpořit vznik zhoubného nádoru. Chronický zánět v průběhu iniciace a progresu nádoru vytváří příznivé podmínky pro mikroprostředí, které přispívá k proliferaci nádorových buněk, přežití, invazi, migraci, remodelaci tkání a angiogenezi (Aponte-López et al. 2018).

3.1.1 Nádorové buňky

Neustálá buněčná proliferace, která není regulována vnitřními mechanismy, jako je tomu u nádorových buněk, vede k zásadním abnormalitám rozvoje nádorového onemocnění (Cooper 2000; Suresh 2007). Je tak důležité pochopení biologie, která je jeho základním vývojem. Bylo prokázáno, že jeden z významných znaků, který charakterizuje nádorové onemocnění, je metabolické přeprogramování s podílem na vývoj a progresi různých typů nádorového onemocnění (Min & Lee 2018). Toto přeprogramování buněčného metabolismu ovlivňuje tumorigenezi v důsledku přímého či nepřímého ovlivnění onkogeními mutacemi (Pavlova & Thompson 2016). Tyto onkogenní mutace způsobují tzv. onkogeny, které jsou klíčovým faktorem pro růst nádoru. Ačkoli bylo identifikováno několik mechanismů pro řízení nádorového onemocnění, role onkogenů při formování metabolických vzorců v nádorových buňkách se teprve začíná oceňovat (Nagarajan et al. 2016).

Mezi jedny z významných onkogenů patří MYC, BRAF a RAS. Stručně řečeno MYC proteiny jsou transkripční faktory, které se vážou na sekvenci zesilovacího boxu (E - box) v genových promotorech a mohou aktivovat nebo potlačovat transkripci, čímž mohou řídit různé aspekty buněčné transformace a růst nádoru (Min & Lee 2018).

Konkrétně se jedná o transkripční regulaci metabolických enzymů, dále se podílí na metabolickém přeprogramování mastných kyselin, glutaminu, prolinu nebo nukleových kyselin přímou transkripční regulací či nepřímou regulací s využitím mikroRNA (Liu et al. 2012; Edmunds et al. 2014). Další skupinou onkogenů je RAS. Program Atlas rakoviny genomu (The Cancer Genom Atlas Program, TGCA), který pochází od Národního institutu pro nádorové onemocnění (National Cancer institute, NIH) odhalil, že při sekvenování v měřítku genomu onkogenní mutace v genech RAS (KRAS, NRAS a HRAS) jsou přítomny ve většině nádorech. Konkrétně geny KRAS se nachází u nádorového onemocnění pankreatu, tlustého střeva a plic. NRAS jsou přítomny zejména 20 % u melanomů, akutních lymfoblastických leukémií a 10 % u akutních myeloidních leukémií. Posledním významným zástupcem genů RAS je HRAS a ten se vyskytuje převážně u karcinomu močového měchýře, krku a hlavy (Nagarajan et al. 2016). Téměř z 60 % u melanomů a karcinomu štítné žlázy, 15 % kolorektálních karcinomů a 5 - 8 % nemalobuněčných karcinomů plic se vyskytuje onkogen BRAF. V savčích buňkách existují tři proteiny RAF, jmenovitě ARAF, BRAF a CRAF. Právě BRAF je převládající kinázou RAF (Zaman et al. 2019). Mutace BRAF a RAS se vzájemně vylučují, což zdůrazňuje skutečnost, že tyto geny regulují překrývající se cesty zahájení a podpory nádorového onemocnění. Mimo jiné také mohou regulovat přímo metabolické dráhy v nádorových buňkách, a na to se zaměří budoucí studie, aby došlo k lepšímu pochopení jejich rolí v metabolismu (Nagarajan et al. 2016).

Cílem metabolismu tak je, aby udržel homeostázu a optimální buněčné zdraví. Podstatou tohoto ideálního stavu je chování normálních buněk při řízení reakce a buněčné odpovědi na příchozí signály z vnějšího prostředí (Kitamura & Motohashi 2018). Proto je základní ochranou organismu proti oxidačnímu a elektrofilnímu stresu nukleární transkripční faktor NRF2, který je hlavním regulátorem buněčné antioxidační odpovědi a více než 20 let po jeho objevení se stal hlavním cílem výzkumů zaměřených na prevenci a léčbu nádorového onemocnění (Rojo de la Vega et al. 2018). Přečasná aktivace NRF2 je zdraví prospěšná, naopak trvalá aktivace NRF2 vede ke zvyšující antioxidační a detoxikační schopnosti nádorových buněk a tím zvyšuje jejich terapeutickou odolnost (Kitamura & Motohashi 2018). V mnoha nádorových buňkách je tato aktivita NRF2 regulována proteinem KEAP1 neboli represorem a dohromady vytváří ochranný mechanismus buňky proti oxidačnímu stresu (Ogura et al. 2010).

Oxidační stres je definován jako relativní přebytek reaktivní formy kyslíku (ROS) nebo dusíku (RNS), který převyšuje nad antioxidační aktivitou v buňce (Hayes et al. 2020). Koncentrace ROS/RNS tak hraje zásadní roli ve vývoji nádorového onemocnění, zejména v proliferaci nádorových buněk (Cheng et al. 2016; Hayes et al. 2020). Při proliferaci nádorových buněk dochází k odchýlení od normálu. Což znamená, že postupem času se buňky stávají odolnější vůči kontrolám a již nereagují na mnoho signálů, které řídí například buněčný růst, a dokonce se vyhýbají programované buněčné smrti. Buněčná smrt, přesněji řečeno buněčná sebevražda, má velký význam pro lidské zdraví. Při zastavení růstu organismu je důležité, aby se vyvážilo buněčné dělení. Tedy počet buněk bude v rovnovážném stavu pomocí aktivního molekulárního mechanismu. Pokud však je dělení nádorových buněk rychlejší než jejich odumírání, nastává tak šíření nádorového onemocnění neboli metastázování (Strasser & Vaux 2020).

Metastáze jsou hlavní příčinou úmrtnosti na nádorové onemocnění. Narušuje funkce orgánů a dochází tak k neomezenému růstu nádorových buněk v normální tkáni. K tomu, aby přežili na novém místě v těle, získají adaptační schopnosti, které se nazývají fenotypová plasticita nádorových buněk. Tato plasticita je ovlivněna extracelulární matricí (ECM) a naopak nádorové buňky přímo či nepřímo ovlivňují změny ve struktuře a složení ECM, která je základní součástí mikroprostředí nádoru (TME) (Poltavets et al. 2018). ECM je strukturou fibrilárních proteinů (zejména kolagenu), pomocných proteinů a molekul, která poskytuje strukturální a biochemickou podporu buňky (Romero- López et al. 2017). Dále ji lze rozdělit do dvou skupin, a to na bazální membrány, které vytváří tenké vrstvy ECM a intersticiální matrici, která vyplňuje intersticiální prostor buňky (Xiong & Xu 2016). Normální ECM versus nádorová ECM se liší v množství, složení a struktuře. Právě nádorová ECM přispívá svými biochemickými a biomechanickými vlastnostmi k vývoji a progresi nádoru (Brauchle et al. 2018).

Ve vývoji a invazivitě nádoru existují významné interakce. Například mezi nádorovou buňkou a stromatem, který se skládá ze specializovaných buněk pojivové tkáně, včetně fibroblastů, mezenchymální stromální buňky, osteoblasty, chondrocyty a extracelulární matrice. Nádorové buňky jsou schopny ovlivnit topografie a molekulární složení stromatu během raného vývoje nádoru, což může na druhou stranu ovlivnit vlastnosti nádorových buněk. Klíčovou roli v progresi, metastázování a vytváření mikroprostředí nádoru hraje obousměrná komunikace mezi nádorovými buňkami a buňkami stromatu, včetně endoteliálních, imunitních a stromálních buněk podobné fibroblastům (Papaccio et al. 2017).

Fibroblasty vylučují ECM, která funguje jako přirozená bariéra proti progresi nádoru, a naopak podpora progresu nádoru může modifikovat ECM. V této souvislosti fibroblasty a myofibroblasty, dohromady se označují jako fibroblasty, spojené s nádorovým onemocněním (CAF), které produkují proteiny, jako je kolagen, fibronectin, α -aktin a další, ty následně, za poškození ECM (Kashima et al. 2019). Původ a funkce CAF jsou pravděpodobně rozmanitě využívány jako markery k jejich identifikaci. Poskytují ucelený obraz o jejich složení, vývojové linii a funkční roli v různých fázích progresu nádorového onemocnění (LeBleu & Kalluri 2018).

3.1.2 Nádorové markery

Objev nádorových markerů se v onkologii datuje přibližně od poloviny 60. - 70. let 20. století. Tento objev vzbudil nadšení, že takové molekuly mohou být použity v boji proti nádorovému onemocnění. Například jako včasná diagnostika, využití screeningových metod, sledování terapie či prognózy a predikce terapeutické odpovědi (Kulasingam et al. 2017).

Jedná se o biochemické látky, které jsou spojené s malignitou. Tyto markery jsou produkovány nádorovými buňkami nebo tělem v reakci na přítomnost nádorových buněk (Nagpal et al. 2016). Obvykle se jedná o bílkoviny, které se vyskytují u pacientů s nádorovým onemocněním prostřednictvím, které lze onemocnění identifikovat především z moči a krve, ale také ve stolici, nádorech či jiných tkáních nebo tělních tekutinách (Pirsaheb et al. 2019).

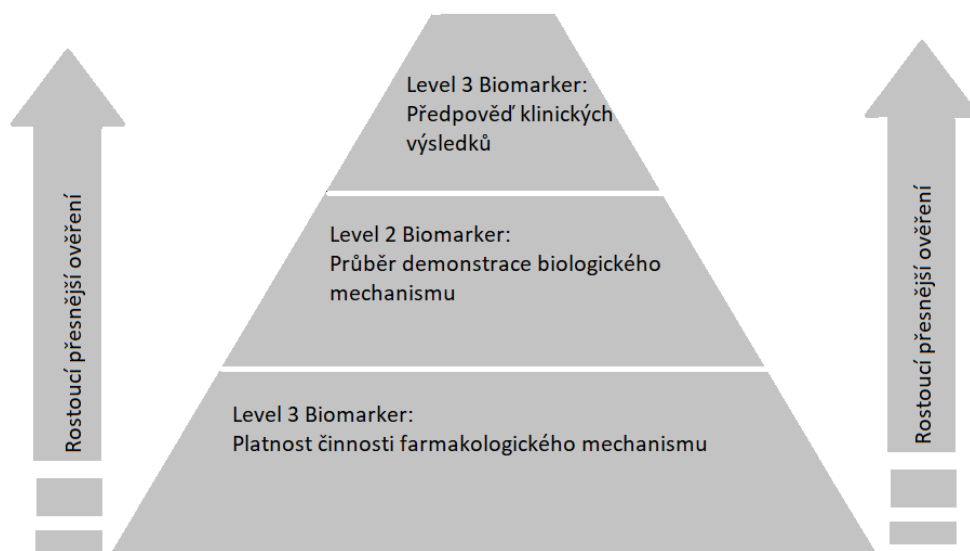
K takovému odhalení slouží screeningové metody, které stanovují tyto nádorové markery a díky nim dochází ke včasnému odhalení nádorového onemocnění u lidí, kteří nemají žádné příznaky nemoci. Včasné odhalení se většinou nachází už v raném stádiu. Přesto bylo zjištěno, že pouze některé druhy nádorových markerů dokážou detekovat nádorové onemocnění, a proto je lze s jistotou identifikovat pouze pomocí biopsie. Novější markery jsou dokonce schopny posoudit, jak agresivní nádorové onemocnění bude či jak dobře bude reagovat na některé druhy léků. Ovšem nejdůležitější využití markerů je ve sledování pacientů, kteří se léčí s nádorovým onemocněním. Při léčbě se sleduje hladina nádorových markerů, pokud hladina klesá znamená to, že léčba funguje a má příznivé účinky. Naopak když hladina stoupá, tak léčba nefunguje a měla by být zvážena jiná forma (Nagpal et al. 2016). V dnešní době je důležité hledat jednoduché, cenově dostupné, vysoce citlivé a přenosné technologie pro kvantitativní detekci cílových proteinů v klinických analýzách a lékařských diagnostikách. Dlouhou dobu si zlatý standart udržuje konvenční test ELISA, neboli enzymově vázaný imunisorbentní test, který detekuje proteiny, patogeny, protilátky a další biomolekuly ve složitých matricích (Zhang et al. 2019).

Přesto, že biomarkery se mohou zdát jako vhodné indikátory, existují dva významné problémy. První je jejich identifikace, kde je velmi častá nedostatečná spolehlivost. Normální i nádorové buňky mohou produkovat většinu nádorových markerů, ale ne všechny dokážou detekovat nádorové onemocnění. Další problém je při identifikaci. Lidé s nádorovým onemocněním nemusí mít pokaždé zvýšenou hladinu biomarkerů a to samé platí při raném stádiu, kdy nemusí být vždy přítomny. Někdy jsou hladiny nádorových markerů vysoké, ale nejsou dostatečně specifické, a proto mohou být přítomny kvůli jiným zánětlivým onemocněním (Nagpal et al. 2016).

Biomarkery se nevyužívají pouze pro detekci nádorového onemocnění, ale představují potenciál ve vývoji léků pro farmaceutické společnosti, které se snaží zvýšit svou produktivitu ve vývoji ve všech terapeutických oblastech, včetně onkologie z hlediska obchodu, a zároveň se snaží snížit čas a náklady spojené s vývojem nových onkologických léků (Floyd & McShane 2004). Skutečnost je taková, že od té doby, co vznikl v 50 letech 20. st. první protinádorový lék, se produktivita neustále zvyšuje (Magalhaes et al. 2018).

V roce 2019 tak bylo schváleno Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) přibližně 48 nových léků a tento trend se stále drží od roku 2017 (De la Torre & Albericio 2020). Tento nárůst vysvětluje, že farmaceutické společnosti mají nebývalé investice do výzkumu nádorového onemocnění, v důsledku neustálého růstu celosvětové poptávky po antineoplastických látkách. Tento relevantní růst, který je spojován s prudce vysokými náklady, je zároveň doprovázen velmi složitými procesy ve výzkumu a vývoji zaznamenanými v posledních dvou desetiletích. Dalo by se považovat, že tyto vysoké náklady na výzkum a vývoj jsou nevýhodou směřovanou na farmaceutický průmysl, protože se zaměřují na složité nemoci a jedná se tak o odvětví založené na špičkových znalostech, inovativních a nesmírně nákladných technologiích (Magalhaes et al. 2018). Přesto Národní institut zdraví (NIH), který je součástí amerického ministerstva zdravotnictví a sociálních služeb zřídil pracovní skupiny, které kladou důraz na význam biomarkerů v oblasti lékařské diagnostiky, aby tak urychlili a ještě více zlepšili produktivitu vývoje léků (Floyd & McShane 2004).

Biomarker se zhodnotí na základě laboratorní analýzy, kde se stanoví jeho přesnost použití, přijatelnost podmínek a reprodukovatelnost. Vývoj onkologických léků je tedy založen na odstupňované sadě klinických biomarkerů, které jsou optimalizovány progresivním postupem na tři úrovně (viz Obrázek 1). Přesto je hodnocení biomarkerů v klinických studiích velmi náročné, protože požadují rozsáhlé systematické testování, ale také proto, že určení může být adekvátní nebo relevantní, komplikované či svévolné (Chen et al. 2015).



Obrázek 1: Vývoj onkologických léků je optimalizován progresivním postupem hierarchicky kategorizovaných biomarkerů, které podporují stále kritičtější o důvěře účinnosti sloučenin s každým zvýšením úrovně (Floyd & McShane 2004).

V současné době existují potíže s hledáním nových účinných biomarkerů. Existují stovky, ne-li tisíce popsanych biomarkerů s vysokou specifitou (>90 %), ale relativně s nízkou citlivostí (<30 %). Tyto biomarkery se nazývají „vzácné nádorové markery“. Je poměrně nepravděpodobné, že by existovaly neobjevené vysoce citlivé biomarkery. Proto The Early Detection Research Network (EDRN) byl pověřen Národním onkologickým institutem (National Cancer Institute, NCI) v USA, aby objevil, ověřil a propagoval biomarkery pro včasnou diagnostiku (Kulasingham et al. 2017).

Například kolorektální karcinom, pro většinu znám jako rakovina tlustého střeva, je celosvětově třetí nejčastěji diagnostikovaná forma nádorového onemocnění. Prognostickým faktorem, u pacientů s kolorektálním karcinomem, je přítomnost nebo nepřítomnost metastáz nádorových buněk v regionálních lymfatických uzlinách. Z tohoto důvodu se jeví užitečnost kombinace vybraných mRNA biomarkerů pro analýzu lymfatických uzlin. Konkrétně se jedná o kvantitativní reverzní analýzu transkriptázy-polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR), kde u podílu pacientů s kolorektálním karcinomem ve stádiu I až IV exprimují hladiny mRNA biomarkerů nad hladiny kontrol uvedené v Tabulce 1 (Olsson et al. 2020). Nejenom, že kolorektální karcinom (KK) patří mezi nejčastější formy nádorového onemocnění, ale je také jednou z hlavních příčin úmrtí (Mitrovic et al. 2012). Jeho výskyt je převážně v západních zemích, ale v posledních letech se zvyšuje i v daleké východní Asii. Rostoucí výskyt je problém a s ním spojovaná mortalita i morbidita. Proto se KK stal hlavním předmětem ve výzkumech týkajících se jeho etiologie, diagnostiky a léčby (Gandomani et al. 2017).

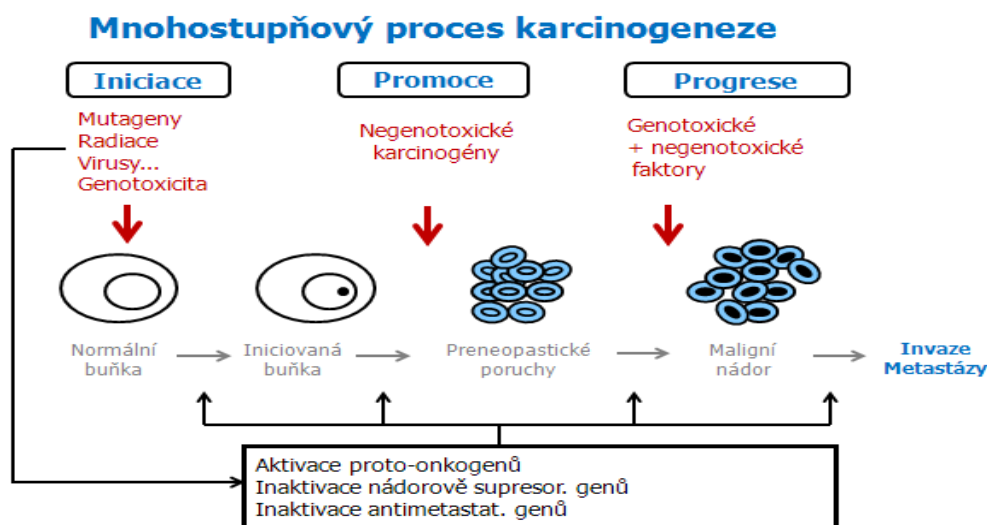
Tabulka 1: Frakce 166 pacientů s KK s hladinami exprese mRNA biomarkerů v jejich nejvyšší lymfatické uzlině nad hladinou stejného mRNA biomarkerů v lymfatických uzlinách u kontrolních pacientů (Olsson et al. 2020).

Biomarkery	Stupeň			
	I	II	III	IV
CEACAM5	57	59	41	100
KLK6	22	11	54	75
SLC35D3	18	9	25	79
MUC2	13	9	30	41
POSTN	25	13	32	69

CEACAM5 – Karcinoembryonální antigen 5; KLK6 – Kallikrein 6; SLLC53D3 – Rodina nosičů solute – Solute carrierfamily (SLC) gen 53D3; MUC2 – Mucin 2; POSTN – Periostin.

3.1.3 Karcinogeneze

Karcinogeneze je vícestupňový proces, při kterém normální buňky získávají genetické a epigenetické změny, které vedou k rozvoji nádorového onemocnění. Tento proces se dělí celkem na tři fáze, a to iniciaci neboli zahajovací fázi, podporování a progresi (Obrázek 2) (Basu 2018).



Obrázek 2: Vícestupňový proces karcinogeneze, který zahrnuje zahájení, podporování a progresi nádor (Hofmanová 2013).

První fáze karcinogeneze je iniciace, která je definována jako stabilní dědičná změna. Tato fáze je rychlá a nevratná. Jedná se o působení iniciačních látek, díky kterým dochází ke genetickým změnám nebo mutacím. Výsledkem je vytvoření iniciované buňky (Gupta 2020). Následujícím krokem je šíření neboli promoční fáze nádorových buněk, její podstatou je intravazace (Borriello et al. 2020). Část nádorových buněk vstupuje do krevního řečiště, kde se snaží přežít a extravazují se za vzniku metastáz (Strlic & Offermanns 2017; Wei et al. 2020).

Metastáze tak představuje nejsmrtelnější aspekt nádorového onemocnění (Wei et al. 2020). Podle studie (Butler & Gullino 1975; Chang et al. 2000) na nádorech u hlodavců a lidí, kterým byl každý den odebrán vzorek tisíce buněk z primárního nádoru vstupujících do primárního krevního řečiště, došlo pouze u několika z nich k vytvoření metastáz. Za omezený vznik metastáz z primárního nádoru je pravděpodobně zodpovědná vysoká rychlost apoptózy nádorových buněk v rámci oběhového systému a činnosti imunitního systému, který se snaží účinně napadat a ničit nádorové buňky (Chen & Mellman 2017). Konečná fáze vzniku metastáz nastává, když se nádorové buňky vyhnou činnosti imunitního systému a dostanou se oběhovým systémem na metastatické místo, jehož poloha je definována podle typu nádoru a okolní tkáně (Kitamura et al. 2015).

Podle okolní tkáně lze klasifikovat nádorové onemocnění do několika hlavních kategorií. První kategorií jsou **lymfomy**. To je druh nádoru lymfocytů (Rashid 2017). Působením nezralých lymfocytů v kostní dřeni vzniká neoplastické onemocnění krve tzv. leukémie (Abbas & Mohamad 2014). Akutní lymfoblastická leukémie, někdy přezdívána akutní dětská leukémie, se běžněji vyskytuje u dětí. Naopak chronická a myeloidní leukémie se u dětí vyskytuje poměrně vzácně. Leukémické buňky tak především ovlivňují krev a kostní dřeň, ale napadají i další okolní části těla, jelikož se šíří prostřednictvím oběhového systému (Rehman et al. 2018). Další kategorií tvoří **sarkomy**. Jednotlivé typy se klasifikují dle Světové zdravotnické organizace (WHO – World Health Organization), a to na sarkomy měkkých tkání, které tvoří vzácnou skupinu a kostní nádory (Casali et al. 2020). Jedná se o malignitu způsobenou změnou buněk mezenchymálního původu v kostech, svalech nebo v pojivové tkáni (Rashid 2017). Předposlední kategorií tvoří **karcinomy**. Karcinom je jakýkoli maligní nádor vzniklý z epitelální tkáně lemující vnitřní a vnější povrch těla. Většinou se jedná o malignity jako rakovina prsu, tlustého střeva a plic (Wright et al. 2011). Závěrečnou kategorií představují **blastomy**, které vznikají v embryonální tkáni orgánů z nediferenciovaných buněk. Rizikovou skupinou jsou děti, ale se mohou zřídka objevit v rané dospělosti, obdobně jako leukémie (Harada et al. 2006). Mezi opravdu vzácné maligní nádory patří dětské nádory plic. Tyto nádory se dělí na tři podskupiny: plicní blastom, fetální adenokarcinom a pleuropulmonální blastom (PPB) (Brodowska-Kania et al. 2016).

Ovšem úplně nejzákladnější klasifikace nádorů je na dvě třídy, benigní a maligní. Benigní nádor zůstává omezen na svém místě, nenapadá okolní tkáně a nešíří se (nemetastazuje) do ostatních částí těla. Maligní nádor neboli zhoubný je opakem benigního nádoru, tudíž roste a má tendenci napadat okolní tkáně. Pouze zhoubné nádory lze označit jako nádorové onemocnění nebo karcinogeneze (Samah et al. 2017).

Karcinogeny

Iniciátorem karcinogeneze je tzv. „úplný karcinogen“. Tyto karcinogeny poškozují buněčné makromolekuly, jako je DNA a způsobují její poškození prostřednictvím endogenních nebo exogenních procesů (Barnes et al. 2018). Mezi endogenní látky patří intracelulární organely nebo zdroje zánětu. Exogenní zdroje zahrnují xenobiotika, léčiva nebo záření (Klaunig & Wang 2018). Vystavení těmto účinkům je spojeno s různými formami poškození DNA, jako je spojení karcinogenu a DNA přes kovalentní vazbu nebo jednořetězové a dvouřetězové zlomy DNA apod (Barnes et al. 2018).

V rámci karcinogeneze závisí na množství a délce expozice karcinogenů. Buď dochází k opakované expozici malých dávek nebo jednorázové větší dávce, která vede ke karcinogenezi. V dnešní době existuje několik karcinogenních látek, kterým je člověk vystavován. Jsou to například polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), aromatické aminy, které jsou přítomny v barvivech, nitrosloučeniny, sloučeniny chlóru, niklu a arsenu, aflatoxiny, vinylchlorid, výfukové plyny z diesellových motorů, tabákový kouř, UV světla, gama záření a další (Basu 2018).

Stejně jako klasifikace u nádorového onemocnění podle typu okolní tkáně, které jsou zmíněny v kapitole karcinogeneze, se i karcinogeny rozdělují na dvě základní skupiny, a to chemické a fyzikální karcinogeny (Barnes et al. 2018). S cílem vyhodnotit karcinogenní rizika spojená s chemickými látkami zahájila už na počátku 70. let 20. století Mezinárodní agentura pro výzkum nádorového onemocnění (IARC, International Agency for Research on Cancer) tzv. program monografií, který pravidelně identifikuje, hodnotí a provádí komplexní kontrolu důkazů o jejich karcinogenním potenciálu pro lidi a zvířata (Birkett et al. 2019). Ovšem tato identifikace nebezpečí je zastaralá, protože takto rozdělené kategorie zařazují do stejné kategorie chemikálie a látky s velmi rozdílnou účinností a způsoby působení (Boobis et al. 2016). V závěru tak účastníci programu monografií dospěli, že karcinogeny obvykle vykazují jednu nebo více z 10 klíčových charakteristik (Tabulka 2). Do budoucna by tyto klíčové charakteristiky měly pomoci pracovníkům těchto monografií při hodnocení dalších potenciálních lidských karcinogenů (Smith 2019).

Tabulka 2: Klíčové vlastnosti karcinogenů (Smith 2019).

1.	Je elektrofilní nebo může být metabolicky aktivován na elektrofilny
2.	Je genotoxický
3.	Mění opravu DNA nebo způsobuje genomickou nestabilitu
4.	Indukuje epigenetické změny
5.	Indukuje oxidační stres
6.	Indukuje chronický zánět
7.	Je imunosupresivní
8.	Moduluje účinky zprostředkované receptorem
9.	Způsobuje nesmrtelnost
10.	Mění buněčnou proliferaci, buněčnou smrt nebo přísun živin

Například riziko z hlediska chemických látek hrozí především zaměstnancům, kteří tyto látky vyrábí, zpracovávají, manipulují, skladují, přepravují nebo eliminují. Povinností zaměstnavatele tak je provést posouzení rizika za účelem ochrany lidského zdraví. V dnešní době je ovšem toto posouzení velmi náročné. Může se stát, že v zaměstnání dojde k chronické expozici karcinogenů a mutagenů, které by mohly být nedostatečně stimulovány (Cesare et al. 2017). Aby se tak zabránilo nepříznivým účinkům chronické expozice, plýtvání penězi, časem i zvířaty během dvouletých biologických testů. Využívají se tzv. testy akčního režimu, kterými je možné zajistit přímý a racionálnější základ pro posouzení rizika (Cohen et al. 2019).

3.1.4 Faktory ovlivňující nádorové onemocnění

Pro zajištění a posouzení racionálního rizika je nutno stanovit působení endogenních a exogenních faktorů. Například při poškození makromolekul, jako je DNA dochází právě prostřednictvím endogenních a exogenních procesů (viz předchozí kapitola karcinogeny) (Barnes et al. 2018). Stanovení tak typických endogenních faktorů představuje pohlaví, věk, genetika nebo doprovodná onemocnění. Naopak mezi exogenní faktory patří například faktory okolního prostředí, mezi něž se řadí a má hlavní klíčovou roli výživa (Mogos et al. 2018).

Výživa představuje udržení homeostázi a odpovědnost za příjem zdravotně nezávadných potravin nese Světový potravinový program a Organizace pro výživu a zemědělství v rámci OSN. Potraviny, ať už rostlinného či živočišného původu, vykazují významné nutriční hodnoty pro správné fungování a vývoj těla. Ovšem na druhou stranu bylo u některých potravin prokázáno, že látky které obsahují, mohou hrát významnou roli v patologických procesech, a dokonce i v karcinogenezi (Đorđević et al. 2020). Tyto látky jsou zastoupeny třeba v potravinářských přídatných látkách, kontaminujících látkách jako pesticidy, insekticidy a polyvinylchlorid (PVC), látky znečišťující prostředí, tj. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) a přirozeně vyskytující se karcinogenní látky. Porovnání karcinogenních látek přijmutých z potravy oproti množství látek dostávajících se do plic nebo do kůže je značně nebezpečnější. Skutečnost je taková, že člověk potravinářské výrobky konzumuje po celý život, tudíž organismus je vystaven po dlouhodobé časové období karcinogenním látkám. Nebezpečné je i požívání malých dávek, jelikož karcinogenní látky jsou kumulativní, tudíž po letech může nastat maligní odpověď (Mogos et al. 2018). Příkladem mohou být potraviny, které obsahují chemické sloučeniny, a tím se označují jako pravděpodobné lidské karcinogeny. V posledních letech tak přilákaly pozornost veřejnosti a zahájila se debata o vhodném způsobu jejich tepelné úpravy (Rasinger et al. 2018). Typickým příkladem je červené maso, které se vyznačuje vysokým obsahem železa. Tím že se při jeho vaření použijí vysoké teploty, chová se jako mutagenní činidlo, které bude vytvářet prokarcinogenní sloučeniny (Ksouri 2019).

V potravinách se také vyskytuje i nespočet přirozených kontaminantů. Mezi nejzlověstnější patří růst plísní, které produkují mykotoxiny, zejména karcinogenní aflatoxiny. V opačném případě se mohou do potravin přidávat chemické látky, většinou ve formě přídatných látek za vylepšení jejich sensorické stránky nebo obohacení nutričních hodnot či snížení nákladů (Pressman et al. 2017).

Další skupinou kontaminantů jsou endokrinní disruptory. Jedná se o skupinu exogenních látek, které inhibují základní funkce hormonů a také se snaží napodobit jejich působení. Tyto disruptory se u nás v životním prostředí nachází v poměrně velkém množství a jsou považovány za velmi škodlivé látky jak u lidí, tak u divoké zvěře. Mezi zajímavý, významný a nejběžnější edokrinní disruptor patří bisfenol A (BPA) (Ijaz et al. 2020). BPA je široce uplatňován jako změkčovadlo v mnoha průmyslových výrobcích. Snadno se uvolňuje do životního prostředí a do potravin z obalových materiálů. Jeho expozice pro člověka je tedy značná a bylo prokázáno, že způsobuje mnoho chronických stavů lidského zdraví, včetně nádorového onemocnění, kardiovaskulárních poruch, hepatotoxického účinku, polycystického onemocnění vaječníků nebo cukrovky (Nomiri et al. 2019).

Vzhledem k jeho rozsáhlé toxicitě se v Kanadě, Evropské unii, USA a některých dalších zemích zakázal používat v produktech a obalech každodenního použití (Liao et al. 2012). Proto se začal používat bisfenol S (BPS) jako alternativní a tepelně stabilnější analog BPA. Tato struktura se skládá ze dvou fenolových kruhů spojených sírou. Používají se již v konzervovaných nealkoholických nápojích nebo v konzervovaných potravinách jako stabilizátor (Zenata et al. 2017). BPS tak díky své vysoké stabilitě a odolnosti vůči slunečnímu záření má být bezpečnější než BPA. Ovšem i zde vyvstávají pochybnosti o jeho bezpečnosti, protože byl prokázán jeho výskyt v lidské moči (Liao et al. 2012).

Z toho vyplývá, že u 70 % nádorů je nesprávná výživa zodpovědná za 40 % všech úmrtí na dané typy nádorů. Změny prováděné v souvislosti s nádorovým onemocněním mohou vést ke ztrátě chuti v důsledku poškození chuťových receptorů vyvolávající pocit sytosti, anorexie, nevolnosti, zvracení a průjmu. Důležitou roli také hraje životní styl. Ze strany výživy to jsou stravovací návyky, konzumace konzervovaných potravin, geneticky modifikovaných potravin jako ovoce a zelenina, potravinové zbytky pesticidů a nezdravý životní styl, jako je kouření, alkohol, obezita, stres a konzumace rychlého občerstvení (Ksouri 2019).

Další, již zmíněný, rizikový faktor pro vznik nádorového onemocnění je obezita, která se v současné době definuje jako zvýšený index tělesné hmotnosti, což je obvykle důsledek přebytku tukové tkáně. Tuková tkáň je nedílnou součástí signalizační sítě, která udržuje energetickou homeostázu (Iyengar et al. 2016). Například homeostáza glukózy je metabolická souhra mezi orgány pankreatu, játry, ledvinami, tukovou tkání a kosterním svalstvem, které regulují ukládání, uvolňování a využívání glukózy pro všechny buňky v těle (Hopkins et al. 2016). Proto při hyperadipozitě dochází k metabolickým poruchám, změně produkci steroidních hormonů a chronických subklinických zánětů. Obezita je rizikovým faktorem pro několik typů nádorů, včetně nádorového onemocnění prsu, dělohy, prostaty, pankreatu a tlustého střeva (Iyengar et al. 2016). Mimo jiné také přispívá i k dalším závažným onemocněním, včetně kardiovaskulárních chorob a cukrovky (Ligibel et al. 2014). Míra obezity stoupá a Americkou lékařskou asociací byla klasifikována jako chorobný stav. Tento chorobný stav by svojí významností mohlo překonat kouření jako preventivní příčina nádorového onemocnění. Vše je shrnuto v Tabulce 3, kde Mezinárodní agentura pro výzkum nádorového onemocnění (International Agency for Research on Cancer, zkráceně IARC) stanovila existující důkazy o tom, že nadměrná tělesná hmotnost souvisí se zvýšeným rizikem nádorového onemocnění nejméně na 13 místech v těle (Lauby - Secretan et al. 2016).

Ovšem ještě důležitější faktor související se zvyšujícím se rizikem nádorového onemocnění je kouření, respektive cigaretový kouř. Proto je jeden z nejdůležitějších kroků zabránit lidem kouřit (Hecht 2002). Cigaretový kouř je obecně označován za karcinogen a je jednoznačně hlavní příčinou rakoviny plic (Hecht et al. 2017). Kouřením tabáku tak ročně zemře více než 7 milionů lidí a z toho necelý půl milion tvoří roční úmrtí pouze ve Spojených státech amerických (Hussain et al. 2019). V tabákovém kouři je více než 7000 chemikálií a více než 70 identifikovaných chemických karcinogenů. Mezi karcinogeny patří PAU jako je benzo(a)pyren, nitrosaminy, kadmium a beryllium, kyanovodík, oxid uhelnatý a amoniak. Důležitou složkou v cigaretovém kouři je také nikotin. Samotný nikotin není označován přímo za karcinogen, ale jedná se o návykovou složku, díky níž si člověk vytváří závislost. Ovšem může být metabolizován za vzniku karcinogenních N-nitrosoaminů, včetně N-nitrososonornikotinu a nitrosaminketonů (Hecht et al. 2017; Harris 2018).

Tabulka 3: Epidemiologické důkazy spojující riziko nadváhy/obezity a nádorového onemocnění podle úrovně důkazů a síly relativního zvýšení rizika nadváhy/obezity ve srovnání s normálním indexem tělesné hmotnosti ($18,5 - 24,9 \text{ kg/m}^2$) (Avgerinos et al. 2019).

Úroveň důkazů	Síla zvýšení relativního rizika pro riziko obezity a rakoviny		
	Vysoký (zvýšení RR ≥ 3)	Střední (nárůst RR: 1,50-2,99)	Malý (nárůst RR: 1,00 - 1,49)
Přesvědčivé / dostatečné	Endometriální adenokarcinom Adenokarcinom jícnu	Adenokarcinom ledvin Hepatocelulární rakovina Adenokarcinom pankreatu Rakovina žaludku Mnohočetný myelom Meningiom	Kolorektální karcinom Postmenopauzální rakovina prsu Rakovina žlučníku Rakovina vaječníků Rakovina štítné žlázy
Omezený		Pokročilé stadium rakoviny prostaty Rakovina prsu u mužů Difúzní velký B-buněčný lymfom	

RP – relativní riziko.

Snad ještě zajímavější je radioaktivita tabáku. Jako první před 50 lety Radford a Hunt zveřejnili článek, ve kterém identifikovali radioaktivní polonium-210 (^{210}Po) v tabáku. Jeho biologický význam nabývá z hlediska farmakokinetiky těžkých kovů a přenosu energie alfa částic. ^{210}Po nepředstavuje nebezpečí z důvodu vnější expozice tabákových listů nebo rostliny, ale inhalací cigaretového kouře, jehož sloužkou jsou právě alfa zářiče, které představují potenciální riziko vzniku rakoviny plic (Karagueuzian et al. 2012; Laking 2019). Na základě důkladných studií se později zjistilo, že tabákový průmysl o radioaktivitě tabáku, a tudíž o přítomnosti radioaktivního ^{210}Po , který tak představuje vyšší potenciální riziko pro rozvoj rakoviny plic, věděl a téměř skoro půl století byly tyto informace nepřístupné. Průmysl tak selhal, nejenom díky dezinformaci svých spotřebitelů, ale také neústupně vzodoroval ve snaze odstranit radionuklid z tabákových listů a zakázal veškeré publikace, které by souvisely s radioaktivitou v cigaretovém kouři. Až soudem nařízenou hlavní dohodou z roku 1998 došlo k vyrovnání velké části výsledků výzkumů interního tabákového průmyslu (Karagueuzian et al. 2012).

Stejně tak nemusí jít vždy pouze o rakovinu plic, ale nedávné studie ukázali, že cigaretový kouř může také vést k nádorovému onemocnění dutiny ústní, jícnu, žaludku, pankreatu, ledvin a močového měchýře. Karcinogeny přítomny v cigaretovém kouři vedou k poškození DNA, narušení mechanismu opravy DNA či oslabení imunitního systému, což dále vede k infekcím a zánětům (Hussain et al. 2019). Proto by lidé měli snižovat dávky tabáku, až jeho úplné odvyknutí a společně se snižováním nadváhy či obezity by představovaly tak nejdůležitější změny životního stylu ovlivňující zejména lidské zdraví a nádorové onemocnění (Avgerinos et al. 2019).

Kouření tabáku však není jediný způsob vzniku rakoviny plic. Většinou se jedná o nekuřáky, kteří jsou vystaveni pasivním expozicím kouře na pracovišti (El Zoghbi et al. 2017). Ta je zodpovědná za více jak 50 000 úmrtí ročně mezi nekuřáky USA. Zákon o nekuřáckém ovzduší v USA i v zahraničí se týká zejména zákazu kouření v restauracích, barech či na pracovištích. Tento zákon byl spojován se snížením negativních srdečních a respiračních účinků. Z toho vyplývá, že tento zákon je mocný nástroj k ochraně nejenom pracovníků pohostinství, ale i hostů. Další údaje získané za poslední dvě desetiletí naznačují, že zákony o nekuřáckém ovzduší v USA nemají nepříznivý ale ani pozitivní vliv na zaměstnanost v restauracích a barech. Tato zjištění spíše poskytují důkazy na podporu zákonů pro politiky, kteří usilují o vyvážení ochrany více volebních obvodů, zdraví jejich místního pohostinství a veřejnosti (Shafer 2019).

Přesto snižování dávek tabáku, ne-li jeho úplné odvyknutí, je pro veřejnost nepředstavitelná a stejně tak konzumace alkoholických nápojů (Connor 2017). Lidé konzumují alkoholické nápoje po celém světě více než tisíce let z kulturních, sociálních a náboženských důvodů. Jeho konzumace ovšem přispívá k řadě nepříznivých účinků na zdraví. Například úmyslné či neúmyslné poranění, násilí, akutní otrava alkoholem, cirhóza, fetální alkoholický syndrom a nádorové onemocnění (Gapstur et al. 2018). Alkohol je spojován s nádorovým onemocněním horní části trávicího traktu (dutina ústní, hltan, hrtan a jícn), jater, prsu a tlustého střeva (LoConte et al. 2018). Jaký typ alkoholického nápoje se konzumuje, není podstatné. Všechny alkoholické nápoje obsahují ethanol, který zvyšuje hladinu primárního metabolitu acetaldehydu po požití ethanolu a ten podporuje poškození DNA (Klein et al. 2020).

Povědomí veřejnosti o působení ethanolu a acetaldehydu karcinogenně je nízká. Značná část případů nádorového onemocnění související s konzumací alkoholu je přičítána Spojeným státům americkým, a proto se snaží WHO snížit spotřebu škodlivých alkoholických nápojů, a tím snížit riziko vzniku nepřenosných nemocí. Proto nejlepším preventivním opatřením je alkohol vůbec nepít. Nicméně existují lidé, kteří si na alkohol vytváří závislost (Gapstur et al. 2018). V tomto případě Americký národní institut pro zneužívání alkoholu a alkoholismu (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism – NIAAA) uvádí řadu vzdělávacích programů pro zdravotní pracovníky, které se používají v diagnostice a léčbě nadměrné konzumace alkoholu, jako jsou skupiny pro vzájemnou podporu, léky, behaviorální terapie nebo kombinace těchto strategií (Baum et al. 2018).

3.1.5 Léčba nádorového onemocnění

Diagnostika, preventivní a léčebné opatření pomáhají snížit výskyt některých druhů nádorového onemocnění, jako je nádorové onemocnění prsu, děložního tělíska, prostaty, tlustého střeva, jater, slinivky břišní apod. Proto je nutné, aby se pokrok v léčebných metodách stále zvyšoval. Zdokonalují se tedy technologie a provádí se výzkumy pro zlepšení účinnějších způsobů léčby. Mezi primární a nejúčinnější formu léčby nádorového onemocnění patří chirurgická resekce nádorů (Kydd et al. 2017). Právě chirurgický zákrok je nejčastější léčba u karcinomu tlustého střeva. Podle NCI, který stanovil v letech 2010 až 2012 informační přehled, že 4,5 % americké populace bude diagnostikováno s karcinomem tlustého střeva. Proto v posledních desetiletích došlo ke zlepšení předoperačních hodnocení, zlepšení chirurgických nástrojů i technologií, intraoperačních monitorů a pooperační péče. Místo tradičního odstranění karcinomu prostřednictvím velkých řezů do dutiny břišní se v posledních letech aplikuje posun směrem k minimálně invazivní chirurgii, která přináší velké výhody. Například menší komplikace s ránou, rychlejší návrat střev do normální funkce, a tím rychlejší příjem normální stravy. Stejně tak je kratší pooperační hojení a zotavení (Lee et al. 2017). Po chirurgické resekcí většinou následuje chemoterapie pro zlepšení terapeutické činnosti a výsledků přežití pacientů. Aby chemoterapie a ozařování mohly být účinnější, je potřeba lokalizace nádoru a metastáz v těle. Lokalizace se provádí několika způsoby zobrazení, jako je ultrazvuk, počítačová tomografie, magnetická rezonance nebo pozitronová emisní tomografie. V poslední době byla také schválena nová léčba, a to v podobě imunoterapie (Kydd et al. 2017), jejím cílem je využít imunitní systém těla k vyvolání protinádorové odpovědi. Rozděluje se na pasivní a aktivní formu. Principem pasivní imunoterapie je podání látek, jako jsou monoklonální protilátky, lymfocyty nebo cytokiny, které zvyšují stávající protinádorovou odpověď. Aktivní imunoterapie spočívá ve stimulování imunitního systému k napadení nádorových buněk očkovaním, nespecifickou imunomodulací nebo zaměřením na specifické receptory antigenu (Zhang & Chen 2018). Ve většině případů se tyto typy léčby ukazují jako účinné při léčbě nádorového onemocnění. Často s nimi ale bývají spojovány i nepříznivé vedlejší účinky. Proto je nutné stanovit co nejvíce cílenou léčbu, která má schopnost poskytnout lokalizované užitečné množství léků proti nádorovým buňkám a nepoškodovat tak normální buňky (Kydd et al. 2017).

Skutečnost je taková, že vývoj protinádorových léčeb prochází obrovskými změnami a také má k dispozici mnoho nových přístupů. Bohužel velkou nevýhodou této biologické revoluce v léčbě nádorového onemocnění jsou vysoké náklady a celkové náklady spojené s péčí. Proto Národní institut pro nádorová onemocnění (National Cancer Institute, NCI) připouští, že existuje potřeba stimulovat ověřené vývoje a přijatelné diagnostiky, aby bylo možné udržet krok s explozí nových a cílených léků (Serkova & Eckhardt 2016).

Pro potřeby účinné léčby se většinou spoléhá na dostatečně velkou dávku cytotoxického činidla, která zabijí rychle dělící se buňky, a tudíž vede k jasnému úpadku nádoru. Na druhou stranu činidla nejsou specifická pro nádorové buňky, a proto se projevují negativním vedlejším účinkem, který poškozuje i zdravé okolní tkáň. V posledních letech se tak v klinických praxích využívají tzv. cytostatika, která většinou primárně fungují jako cílové léky se specifíčností proti nádorovým buňkám, narušují buněčnou signalizaci a replikaci, ale nevedou ke snížení okamžité nádorové zátěže (Anttila et al. 2019).

Mezi potenciální cytostatika používaná v léčbě proti nádorovému onemocnění jsou alkaloidy z rostlin čeledi *Amaryllidaceae* (Nair & van Staden 2018). Tato skupina rostlin se vyskytuje převážně v tropických a subtropických oblastech. Jedná se o čeleď rostlin, která je charakterizována a identifikována řadou farmakologicky aktivních látek, které vykazují svou rozmanitost biologických aktivit (Desgagné-Penix 2020), včetně protinádorových, protizánětlivých, antibakteriálních, antifungálních, antimalariických, antivirových, antidepresivních, antinociceptivních a cholinesterázově inhibičních (Ding et al. 2017).

Biologická a protinádorová aktivita alkaloidů *Amaryllidaceae*

Amaryllidaceae je velká skupina jednoděložných rostlin přibližně 1000 druhů v 60 rodech. Bylo prokázáno, že jsou bohatým zdrojem alkaloidů, které se podle biologické aktivity dělí na 9 základních typů v Tabulce 4, to jsou lykorin, homolykorin, krinin, haemanthamin, tazettin, montanin, narciclasin, galanthamin a norbelladin (Habartová et al. 2016). Objevování léčiv na bázi fytochemikálií začalo již v roce 1877 s izolací alkaloidu lykorinu z *Narcissus pseudonarcissus* (Cimmino et al. 2017). Ovšem ještě dříve byl izolován v 50. letech 20. století galanthamin z cibule sněženky *Galanthus woronowii*. Tato droga má dlouhodobou historii a nyní je stále důležitým léčebným prostředkem u mnoha onemocnění, například při bolesti nervů a dětské obrně. Až později se začal zkoumat terapeutický účinek galanthaminu pro léčbu Alzheimerovi choroby (AD) (Upadhyay et al. 2020). Obvykle AD představuje 60 až 70 % případů demence s počátečními výpadky paměti, které jsou doprovázeny dalšími kognitivní dysfunkcemi. Z patologického hlediska se jedná o degeneraci v oblasti bohaté na cholinergní neurony, frontální kůru, přední a zadní cingulární kůru. Tyto oblasti jsou spojovány s agitací, apatií a ztrátou paměti. Ukázalo se, že právě acetylcholin (ACh) vysoce koreluje s funkcí paměti, a tak se k léčbě AD využívají nejméně tři inhibitory cholinesterázy (AChEI) schválené americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) (Huang et al. 2020). Dnes je to tedy klinicky schválený lék pro AD ve formě hydrobromidu, ale většinou je znám pod komerčním názvem nivalin. Jedná se o alkaloid, který je dlouhodobě působící, selektivní, reverzibilní a kompetitivní inhibitor acetylcholinesterázy (AChE) se silným 50 % inhibičním účinkem na AChE v mikromolárních koncentracích a také alostericky moduluje nikotinové receptory (Habartová et al. 2016).

Inhibitory AChE způsobují, že acetylcholin je udržován v synaptické štěrbině pro neurotransmici a je odpovědný za ukončení dodávky impulzů rychlou hydrolýzou acetylcholinového neurotransmiteru v cholinergních stádiích, čímž snižuje a předchází symptomy AD. Dalším inhibitorem ve vývoji léků proti AD je butyrylcholinesteráza (BChE), která se syntetizuje v játrech a užívá se při symptomatickém neurodegenerativním onemocnění. Proto se stále hledají novější a účinnější inhibitory, které jsou v centru pozornosti mnoha výzkumných skupin (Türkan et al. 2020).

V současné době jsou dobře prozkoumány farmakologické a fytochemické aspekty alkaloidů, nicméně jejich molekulární a fyziologické vlastnosti už méně. Proto je poměrně lepší snažit se porozumět také jejich biosyntéze (Obrázek 3) a metabolické regulaci, protože to jsou výhody, které se využívají v nových technologiích metabolického inženýrství pro zlepšení účinnosti a udržitelnosti produkce alkaloidů rostlin *Amaryllidaceae* (Desgagné - Penix 2020, Cimmino et al. 2017).

Obecně platí, že biosyntéza alkaloidů je na principu kondenzace dvou aromatických aminokyselin. Jak je vidět na Obrázku 3, jedná se o L-fenylalanin a L-tyrosin ze kterých vzniká O-methylnorbelladin jako základní vstupní bod pro komplexní biosyntetickou dráhu. Následuje řada reakcí, jako jsou formace vazeb, rozbití, předání, přeskupení, přidání funkční skupiny nebo modifikace, a tím se dosáhne velké rozmanitosti alkaloidů. Celkově lze rozdělit biosyntetickou dráhu do 5 etap. První etapa je nazývána jako primární metabolismus, následuje fenylpropanoidní cesta, vznik norbelladinu základní cestou, předposledním krokem je přechodná fáze a završuje to tzv. pozdní etapa (Desgagné-Penix 2020).

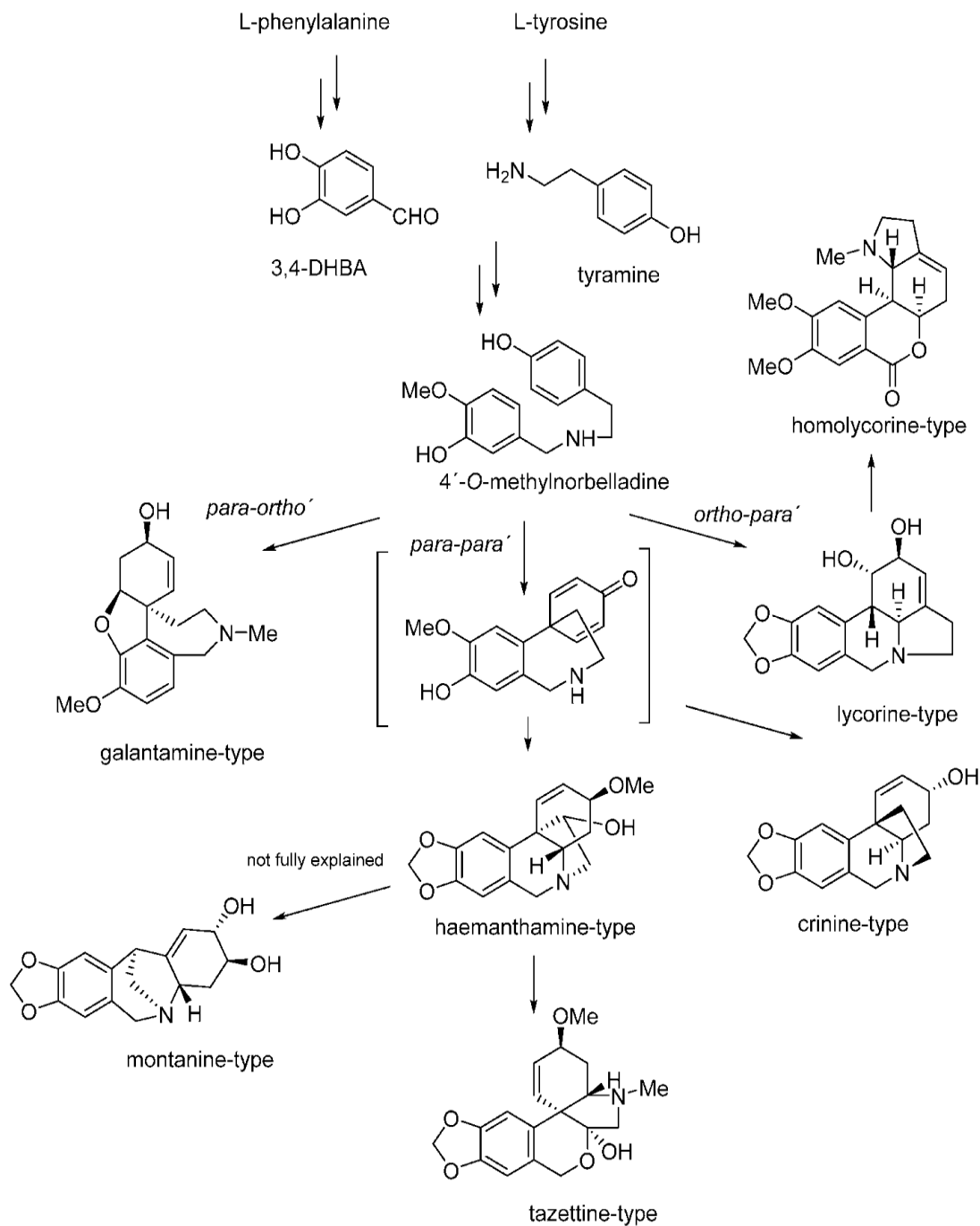
Prostřednictvím biosyntetického původu se *Amaryllidaceae* dělí do 9 kruhů (viz začátek kapitoly) a z toho jejich reprezentativní struktura je znázorněna na Obrázku 4 (Habartová et al. 2016).

Tabulka 4: Typy prstencových a reprezentativních alkaloidů rodu *Amaryllidaceae* (Desgagné-Penix 2020).

Typ alkaloidů <i>Amaryllidaceae</i>	Prstencová struktura	Fenolové spojení	Reprezentativní alkaloidy <i>Amaryllidaceae</i>
Norbelladin	N-(3,4 – dioxybenzyl)-4-oxyfenetylamin		Norbelladin, Rystillin
Cheryllin Galatamin	tetrahydroisochinolin 6H-benzofuro[3a,3,2-e,f]-2-benzazepin	para-ortho ⁺	Cheryllin, Gigantellin Narwedín, Galatamin
Lykorin Lykorenin	Pyrrolo[d,e]fenanthridin 2-benzopyrano-[3,4-g]indol	ortho-para ⁺ ortho-para ⁺	Lykorin, Galantin Homolykorin, Hippeastrin
Krinin	5,10b-etanofenanthridin	para-para ⁺	Krinin, Haemanthamin
Narciclasin	Lykoricidin	para-para ⁺	Narciclasin, Pankratistatin
Tazettin	2-benzopyrano[3,4-c]indol	para-para ⁺	6a-deoxytazettin, Pretazettin
Montanin	5,11-methanomorfanthridin	para-para ⁺	Panracine, Montanin

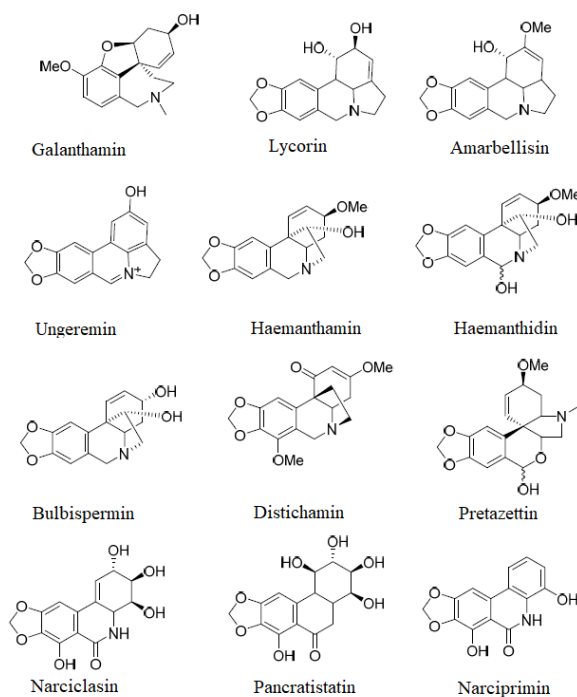
Jedny z nejznámějších a z pohledu cytotoxicity nejúčinnějších jsou alkaloidy lykorinového typu (Dalecká et al. 2013). Podle prstencové struktury se skládají z pyrrolo [de] fenanthridinu a vykazují různé biologické účinky, které zahrnují antivirovou, antimalarickou, protizánětlivou a protinádorovou aktivitu. Nejvýznamnějším zástupcem je lykorin, který svou antivirovou aktivitou působí proti celé řadě virů, jako jsou retroviry, polioviry, enteroviry, koronoviry a další. Princip antivirového účinku je v tom, že lykorin funguje jako inhibitor při syntéze proteinů a tím blokuje aktivitu virové polymerázy, nebo prodloužuje virový polyprotein během syntézy (Roy et al. 2018).

Dalším účinkem je významná inhibice DNA topoizomerázy I, která je vyžadována pro růst buněk u parazitů, a tím lykorin a další alkaloidy lykorinového typu vystupují proti parazitům malárie, jako je právě třeba u *Plasmodium falciparum*, a tím například dochází k pozastavení jejich životního cyklu. Ovšem účinek není pouze čistě proti parazitům, ale může mít také antikvasinkové neboli antimykotické aktivity proti kvasinkám kmenu *Saccharomyces cerevisiae* (Roy et al. 2018).



Obrázek 3: Biosynetická cesta hlavních strukturních typů amarylkovitých alkaloidů (Dalecká et al. 2013).

Posledním významným účinkem alkaloidů lykorinového typu je protinádorová aktivita, kde právě lykorin, jako jeden z prvních, prokázal cytotoxický účinek, a proto byl intenzivně zkoumán v preklinických modelech nádorového onemocnění u lidí *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Ukázalo se, že lykorin je označován jako nízkomikromolární antiproliferační činidlo, které vykazuje cytotoxicitu mitochondriálními cestami a indukcí apoptózy (Khalifa et al. 2018).



Obrázek 4: Struktura alkaloidů rostlin čeledi *Amaryllidaceae* (Habartová et al. 2016).

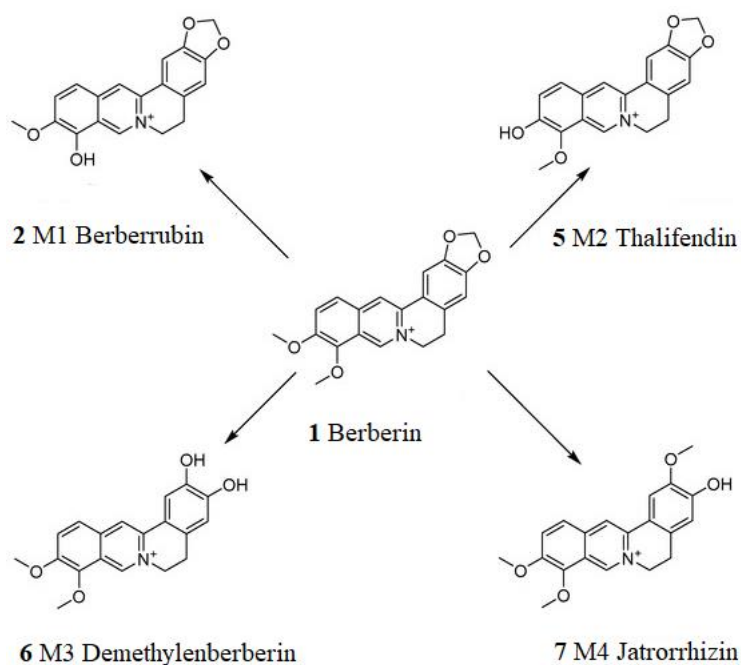
Obdobné vlastnosti jako lykorin má heamanthamin (HAE), který vykazuje silnou inhibiční a cytotoxickou aktivitu proti širokému spektru nádorových buněčných linií. Přestože molekulární mechanismus HAE ještě není zcela pochopen, může inhibovat syntézu proteinů pomocí vazby na centrum peptidyltransferázy (PTC) a ta se váže 60S podjednotku ribozomu, a tím zabraňuje tvorbě peptidových vazeb (Cahlíková et al. 2020).

Inhibice syntézy eukaryotických proteinů tak činí velmi atraktivní cíl pro vývoj protinádorových látek (Pellegrino et al. 2018), jelikož samotná syntéza proteinů hraje důležitou roli při vzniku a progresi nádoru (Truitt & Ruggero 2016). Hlavní zdroj syntézy proteinů jsou ribozomy, které se vyskytují v každé živé buňce. Právě HAE je odpovědný za vyvolání nukleolárního stresu, a tím inhibuje biogenezi ribozomů a aktivuje protinádorovou reakci závislou na proteinu p53 (Pellegrino et al. 2018), což je krátkodobý transkripční faktor a nádorový supresor se stabilizuje a aktivuje v reakci na buněčné stresy (Goodman 2021).

Dále bylo prokázáno, že je schopen vytvořit komplexy s ribonukleovou kyselinou (RNA), kde buňky myšího lymfomu L5178 jsou multirezistentní, což vede k jejich výrazné inhibici růstu (Cahlíková et al. 2020).

Při hledání nových léčiv odvozených od alkaloidů *Amaryllidaceae* není biosyntetická cesta zcela plně pochopena. Některé enzymatické kroky zejména u montaninu oproti galanthaminu zůstávají částečně nepochopeny (Reis et al. 2019). Proto k dalším intenzivně zkoumaným strukturám patří montaninový typ. Obdobně jako heamanthamin a lykordin vykazují inhibici růstu a cytotoxicitu proti nádorovým buňkám v *in vitro* podmínkách. Působí tak proti pěti lidským buněčným liniím, jako je adenokarcinom tlustého střeva HT29, karcinom renálních buněk RXF393, karcinom prsu MCF7, nemalobuněčný karcinom plic H460 a epiteliální ovariální karcinom OVCARR3 s nízkými mikromolárními koncentracemi (Koutová et al. 2020).

Již na začátku této kapitoly byla zmíněna funkce galanthaminu, jakožto alkaloidu s terapeutickým účinkem užívaný při AD. Jedná se o neurodegenerativní poruchu, která ovlivňuje zejména starou generaci. V současné době mimo galanthaminu se také v klinických praxích užívají další alkaloidy, jako jsou mematin, rivastigmin a donepezil. Přesto dnes neexistují žádné léky, které by této nemoci zabránili. Nedávný výzkum zmiňoval, že například berberin má poměrně příznivé účinky na nervový systém a také byl identifikován jako pozitivní terapeutická strategie proti AD druhé generace, kde působí jako inhibitor lidské AChE (Cai et al. 2016). Berberin je kvartérní amonná sůl z protoberberinové skupiny isochinolinových alkaloidů (Cicero & Baggioni 2016, Feng et al. 2019). Má vysoké uplatnění jako bioaktivní složka k léčbě zánětlivých poruch a diabetu získaný z rostlin *Rhizoma coptidis*, která je běžně užívána v tradiční čínské medicíně (Feng et al. 2019). Berberin, tedy jako bioaktivní alkaloid, má mnoho farmakologických účinků, včetně antimalarických, antidiabetických a protirakovinných účinků. Předpokládá se, že i metabolity (Obrázek 5) berberinu mají farmakologické účinky (Cicero & Baggioni 2016).



Obrázek 5: Transformace berberinu fáze I pomocí cytochromu P450 (CYP450) v jaterních buňkách (Cicero & Baggioni 2016).

Ovšem nejvíce klinické studie zkoumaly účinky berberinu pro snižování hladiny lipidů a inzulínové rezistence (Imenshahidi & Hosseinzadeh 2019). Proto je berberin izolován z rostlin, které se dodnes používají jako léčivo nebo bylinné doplňky (Habtemariam 2020).

Izolace alkaloidů rodu *Amaryllidaceae*

Mimo lykorinu, který vykazuje cytotoxickou aktivitu, bylo dále zjištěno, že například látky anhydrolykorin, krinin, galanthamin, demethylmartidin a narwedín jsou přítomny v *in vitro* kulturách *Narcissus pseudonarcissus* a dalších druhů *Amaryllidaceae*, které jsou zejména stanoveny prostřednictvím screeningu plyné chromatografie s hmotnostní spektrometrií (El Tahchy et al. 2011). Alkaloidy z rostlinných materiálů lze rozdělit prostřednictvím chromatografických metod (plynné, kapalné nebo tenkovrstvé), hmotnostní spektrometrie a spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) (Ferdausi et al. 2020). Již v předchozí kapitole se vyzdvihla nejvýznamnější biologická a farmakologická aktivita alkaloidů, kterou je právě inhibiční aktivita AChE. Díky screeningu se tak zjistilo, že alkaloidy *Amaryllidaceae* (AA) obsahují různé strukturní typy a výsledky tak poukazují na to, že typy galanthaminu a lykorinu mají lepší výsledky AChE inhibice než ostatní alkaloidy (McNulty et al. 2010; Ortiz et al. 2012; Cortes et al. 2015).

Než se provede nějaká analýza či identifikace sloučenin alkaloidů pomocí jejich hmotnostních spektrálních vzorců a retenčních indexů a porovná se to s údaji zaznamenanými v literatuře, je nutné, nejdříve alkaloidy izolovat neboli extrahovat z mleté nebo sušené biomasy. U *Amaryllidaceae* se ve většině případech jedná o vysušené cibule v množství 100 až 300 g. Třeba u divokých argentinských druhů *Amaryllidaceae* vyextrahovali alkaloidy pomocí methanolu (MeOH). To znamená, že dochází k odpaření organického rozpouštědla za sníženého tlaku, a tím se získají suché alkaloidové frakce, lépe řečeno suchý extrakt, který byl rozpuštěn v methanolu pro GS – MS analýzu (Ortiz et al. 2012). Ta se provádí v přístroji, který pracuje v režimu EI 105 při 70 eV. Vše poté probíhá v kapilární koloně (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) s teplotou od 120 do 300 °C v různých časových intervalech. Následně tam protéká nosný plyn (Helium, ml/min.) s injektovaným vzorkem. Závěrem je pak identifikace alkaloidů, porovnáním jejich 108 vzorců spektrální fragmentace se standardními referenčními spektry v databázi Národního institutu standardů a technologie (NIST) v USA (Cortes et al. 2015).

Izolace a identifikace AA a nejenom jich, přispívá k tvorbě nových účinnějších látek se sníženými vedlejšími účinky, protože právě rostliny jsou přímým či nepřímým zdrojem více než 60 % protinádorových látek (Khumkhong et al. 2019). Přesto pokrok ve vývoji léků a v léčebných přístupech není úměrný v léčbě nádorového onemocnění (Rodrigues et al. 2018).

3.1.6 Sféroidy

Nejmodernější výzkumy nádorového onemocnění v současné době zahrnují zkoumání podpisu nádorových buněk v mikroprostředí, nebo naopak využívají koncept tkáňového inženýrství, které se snaží lépe porozumět a podnítit terapeutické podání při vývoji nových léků (Eglen & Klein 2017). Přesto pokrok ve vývoji léků a v léčebných přístupech není úměrný v léčbě nádorového onemocnění, protože celkový rozsah vývoje či terapií je menší než 5%. Navzdory významným investicím a nákladům do výzkumu pro nádorové onemocnění, objevu a vývoje léků. Stále tak ty nejpokročilejší stádia metastází nádorů zůstávají nevléčitelná (Hait 2010; Hutchinson & Kirk 2011; Ocana et al. 2011).

Jedním z faktorů, které přispěly ke špatnému vývoji protinádorových léčiv, jsou preklinické modely, které nedokážou adekvátně rekapitulovat složitost a heterogenitu lidského nádorového onemocnění. Proto se diskutuje, zdali dojde k omezení preklinických modelů k hodnocení léčiv. Ačkoli preklinické studie jsou založeny na zvířatech, do značné míry to závisí zejména na *in vivo* modelech myších nádorů, které se nechovají jako lidské. Stejně tak stromální složky nejsou lidského původu. Míra implementace není přirozeným umístěním nádoru, imunitní systém je narušen modely xenograftu a rychlost růstu nádoru xenograftu jsou obvykle rychlejší než primární lidské nádory. Z toho vyplývá, že klíčovou nevýhodou preklinických studií jsou *in vivo* zvířecí modely. Testování tak antiproliferativních léků na zvířatech by mohlo poskytovat nepravdivé údaje o jejich potenciálním účinku (Hutchinson & Kirk 2011, Sant & Johnston 2017).

Ovšem během posledních desetiletí došlo v preklinickém testování nových terapeutik k novému vývoji v podobě sféroidů. Významnou a farmakologicky užitečnou analýzu buněčných odpovědí přinesla tradičně užívaná 2D buněčná kultura v *in vitro* podmínkách (Chatzinikolaidou 2016). Buňky zde rostou v monovrstvě a hodnotí biologickou výkonnost bioaktivních molekul. Používají se tedy jako terapeutika pro nemoci, jako je Parkinsonova choroba, HIV, cukrovka nebo nádorová onemocnění. Staly se tak nejpoužívanějšími modely v preklinických testech, hlavně díky své snadné manipulaci, hospodárnosti, reprodukovatelnosti a schopnosti nesčetného růstu. Využíváním těchto modelů došlo také k snížení počtu laboratorních zvířecích modelů, a zároveň určují počáteční, ale přesto zásadní rozhodnutí typu, jestli zastavit nebo pokračovat ve vývoji léků dál (Breslin & O'Driscoll 2013). Pro ještě lepší vývoj existuje trojrozměrný model neboli 3D, který ve srovnání s 2D modelem dokáže lépe napodobit některé rysy solidních nádorů. Vědci se tak snaží vyvíjet nové systémy buněčných kultur *in vitro*, které lépe reprodukuje vlastnosti nádorů *in vivo* a současně zvýší nový vývoj způsobu léčby v preklinických studiích (Breslin & O'Driscoll 2013, Costa et al. 2016).

2D versus 3D buněčné kultury

Buněčné kultury, ať už se jedná o 2D nebo 3D modely (Tabulka 5a, 5b), jsou nepostradatelné při základním testování biofyzikálních a biomolekulárních mechanismů, které pomáhají buňkám se shromažďovat ve tkáních a orgánech. Dále říkají, jak tkáň fungují a jak je tkáň při nemoci narušena. Buněčná kultura je používána v biomedicínském výzkumu, již několikrát zmíněném tkáňovém inženýrství, regenerativní medicíně a průmyslových postupech (Duval et al. 2017).

Tabulka 5a: Porovnání 2D a 3D buněčné kultury (Jensen & Teng 2020).

Vlastnosti	2D buněčná kultura	3D buněčná kultura
Tvar buněk	<ul style="list-style-type: none"> Ploché a protáhlý tvar, protože buňky mohou růst pouze dvourozměrně. Rostou do monovrstvy na desce. 	<ul style="list-style-type: none"> Přírodní tvar i růst buněk je zachován. Buňky rostou do 3D agregátů/sféroidů. Sféroidy obsahují více vrstev.
Expozice buněk v médiu	<ul style="list-style-type: none"> Všechny buňky na desce dostávají stejné množství živin a růstového faktoru z média. Více buněk je ve stejném životním cyklu. 	<ul style="list-style-type: none"> Živiny nemusí být rozděleny rovnoměrně mezi buňky, ale v případě potřeba ano. Základní buňky bývají často neaktivní, protože přijímají méně živin a růstového faktoru z média. Lepší napodobení chování a struktury nádorové buňky <i>in vivo</i>.
Spojení buněk	<ul style="list-style-type: none"> Méně častá a představují méně skutečná spojení. 	<ul style="list-style-type: none"> Běžnější a představují komunikaci mezi buňkami. Komunikují prostřednictvím výměnných iontů, malých molekul a elektrickým proudem.
Diferenciace buněk	<ul style="list-style-type: none"> Špatně diferenciací. 	<ul style="list-style-type: none"> Dobrá diferenciací.

Tabulka 5b: Porovnání 2D a 3D buněčné kultury (Jensen & Teng 2020).

Vlastnosti	2D buněčná kultura	3D buněčná kultura
Citlivost na léky	<ul style="list-style-type: none"> Malá rezistence → vypadá to jako úspěšná léčba. Léky nejsou dobře metabolizovány. 	<ul style="list-style-type: none"> Buňky jsou odolnější vůči léčbě. Poskytují přesnější účinky léků.
Proliferace buněk	<ul style="list-style-type: none"> Buňky se nepřírozeně rychle dělí. 	<ul style="list-style-type: none"> Míra šíření je realistická → vysoká nebo nízká v závislosti na technice typech studovaných buněk.
Úroveň exprese	<ul style="list-style-type: none"> Úroveň exprese genů a proteinů je často výrazně odlišný od <i>in vivo</i> modelů. 	<ul style="list-style-type: none"> Úroveň exprese genů a proteinů se často podobají hladinám zjištěných z buněk <i>in vivo</i>.
Cena	<ul style="list-style-type: none"> Levnější. 	<ul style="list-style-type: none"> Dražší. Časově náročnější. ↓ počet zvířat při testech.
Apoptóza	<ul style="list-style-type: none"> Léky snadno vyvolají apoptózu. 	<ul style="list-style-type: none"> Vyšší míra rezistence na apoptózu vyvolanou léky.
Odpověď na podněty	<ul style="list-style-type: none"> Nepřesné znázornění reakcí. Buňky nemohou zažít gravitaci, protože jsou neshopné expandovat do třetí dimenze. 	<ul style="list-style-type: none"> Přesné znázornění odpovědi. Buňky mohou zažít gravitaci, což dodává lepší reprezentaci buňky v <i>in vivo</i> podmínkách.
Využití a analýza	<ul style="list-style-type: none"> Vysoce reprodikovatelne Snadno interpretovatelné Lepší pro dlouhodobé kultury 	<ul style="list-style-type: none"> Může být obtížné replikovat experimenty. Obtížnější interpretace dat.

Většina výzkumů týkajících se biologie nádorového onemocnění je založena na experimentech, které využívají dvourozměrné (2D) buněčné kultury *in vitro*. Avšak v poslední době jejich využívání klesá a to proto, že tyto kultury mají poměrně velké omezení. (Kapałczyńska et al. 2018).

U těchto dvourozměrných (2D) modelů jejich omezení vzniká z jiného pramene a to v podobě, ve které nedokážou ideálně napodobit přirozenou strukturu tkáně nebo nádoru. Nejsou zde ani zastoupeny interakce mezi buňkami či buňkami a extracelulárním prostředím tak, jak by bylo v nádorové hmotě (Baker & Chen 2012).

Stejně je tomu, když dojde k izolaci buněk z tkáně a přenosu do 2D podmínek. Nastane změna morfologie buňky, která ovlivní její funkci, organizaci uvnitř buňky, sekreci a buněčnou signalizaci. Další nevýhodou 2D buněčné kultury je, že buňky jsou uspořádány v tzv. monovrstvě, která má neomezený přístup k složkám média, jako je kyslík, živiny, metabolity a signální molekuly. To by v případě *in vivo* podmínek u nádorových buněk bylo variabilnější. Důvodem je právě přirozená nádorová hmota (Kapałczyńska et al. 2018). Vzhledem k těmto nevýhodám, bylo potřeba najít alternativní modely, se schopností lépe napodobit podmínky přirozené nádorové hmoty, jako jsou kultivované trojrozměrné (3D) buněčné kultury (Ferreira et al. 2018), někdy jsou přezdívány jako sféroidy organoidní kultury (Duval et al. 2017).

Tyto buněčné modely mají schopnost simulovat chování buněk v *in vivo* podmínkách za využití *in vitro* metod (Ravi et al. 2015). Oproti 2D modelům využívají 3D modely interakci buněk, jako je tomu u běžné tkáně se stejnými, či obdobnými signálními sítěmi. 3D metody jsou tak vyvinuty za účelem zlepšení buněčné struktury a fyziologické ekvivalci provedených v *in vitro* podmínkách (Ou & Hosseinkhani 2014). V těchto podmínkách jsou sestavovány jako modely mikroskopických buněčných agregátů pro nádorová onemocnění a po svém vzniku tedy dokážou napodobit různé rysy solidních nádorů. Pak se tedy označují jako nádorové sféroidy, které se rozdělují na homotypické a heterotypické sféroidy, kde homotypické se skládají výhradně z nádorových buněk a heterotypické obsahují mimo kultivovaných nádorových buněk ještě další, jako jsou fibroblasty, endotelové buňky nebo imunitní buňky (Costa et al. 2016). Dalším charakteristickým rysem sféroidů je technika, kterou se klasifikují z doslovného překladu angličtiny na tzv. typ techniky založený na scaffoldu neboli lešení nebo bez scaffoldu (Joseph et al. 2018).

Buněčné „lešení“

Strategie založená na lešení hodně spoléhá na biomateriály, protože vytváří dostatečnou strukturu podporující buňky během tvorby tkáně. Lešením tak může být 3D konstrukce spojená póry, hydrogelem s vloženými buňkami nebo jejich kombinací. Ale nejvíce slibným trendem je použití extracelulární matrice (ECM) (Ovsianikov et al. 2018).

Materiál použitý k výrobě lešení je přírodního nebo syntetického původu. Mezi přírodní materiály používané k syntéze lešení patří právě ECM, včetně kolagenu, fibrinu a hyaluronové kyseliny. V případě syntetických materiálů se sem řadí polymery, titan, bioaktivní skla a peptidy. Často jsou nejvíce využívány polymery, a to díky své vysoké pórovitosti, velkému poměru povrchu ku objemu, biodegradaci a mechanickým vlastnostem. Lešení jsou tak navrhována, aby podporovala adhezi buněk, interakci buněk a biomateriálů, přiměřený transport plynů a živin pro růst, přežití buněk a zabránění toxicity. To vše je velmi důležité, aby pak probíhala správná distribuce buněk a jejich růst do 3D prostoru (Joseph et al. 2018). Sféroidy jsou tak tvořeny agregací buněk do těsných dobře definovaných zaoblených objektů (Mittler et al. 2017). Byly proto vyvinuty techniky, které slouží ke generování sféroidů (AU - Foty 2011).

Zejména agarózový povlak standardních mikrotitračních destiček, který vytváří jamky s konkávním dnem používaný k výrobě řady sféroidů a následného velkoplošného screeningu léků ve 3D formátu. Laboratorní potahování však není vždy vhodné pro automatické zobrazování. Kvůli popotávce po vysoce standardizovaných multiplexních sféroidních testech společnost vyvinula doplňky specifické pro sféroidy. Jedná se zejména o destičky, které jsou optimální pro monitorování změn sféroidních fenotypů vyvolaných léky v reálném čase a zároveň usnadňují generování vysoce rovnoměrných sféroidů. Jde o nejpopulárnější desky Corning-spheroid a InSphero GravityTRAP™ ULA (Mittler et al. 2017). Proto se musí identifikovat příslušné výrobní techniky pro konkrétní cílovou tkáň. Ovšem pokud se nebude brát ohled na typ tkáně, je důležité sledovat a brát v úvahu další faktory, které jsou popsány v Tabulce 6 (Joseph et al. 2018).

Například jedna z významných technik založená na lešení je podpora na bázi hydrogelu, který se v tkáňovém inženýrství ukázal jako jeden z nejvíce prominentních a univerzálních materiálů, které mohou být jak přírodního, tak syntetického původu (Hunt et al. 2014). Tyto materiály mají schopnost podporovat buněčnou proliferaci, migraci a diferenciaci, transport kyslíku a živin a napodobovat nativní měkkou tkáň (Spicer 2020). V posledních letech také u nich došlo k velkému pokroku v designu, výrobě a aplikaci. Hydrogely se tak ve většině případech označují jako hydratované polymerní sítě s různými vlastnostmi, které lze syntetizovat s požadovanými fyziologickými vlastnostmi, tím že upravíme chemickou strukturu nebo složení výchozích materiálů, hustoty propojení polymerních řetězců, pružnosti nebo pórovitosti podle biomedicínské aplikace. Díky těmto základním vlastnostem buněčného lešení jsou schopny udržet 3D model (Che et al. 2019). Hydrogelové lešení tak pomáhá opravit nebo znovu vypěstovat poškozenou tkáň, a proto je označováno jako velký potenciál pro onemocnění nebo poranění (Spicer 2020).

Tabulka 6: Požadavky na lešení (Joseph et al. 2018).

Vlastnosti	Účel
Biokompatibilita	Schopnost poskytovat normální buněčnou funkci.
Bioaktivita	Schopnost rychle aktivovat rychlé připojení tkáně k povrchu implantátu.
Biologická rozložitelnost	Možnost, aby buňky mohly produkovat vlastní ECM.
Mechanická odezva	Lešení by mělo být dostatečně silné, aby umožňovalo chirurgickou manipulaci během implantace a musí mít odstatečnou mechanickou integritu pro dokončení porcesu remodelace.
Architektura lešení	Porézní propojená struktura poskytuje buněčnou penetraci a adekvátní difúzi živin do buněk a střední velikost pórů by měla být odstatečně velká, aby umožnila buňkám migrovat do struktury.

Trojrozměrná (3D) buněčná kultury při objevování a vývoji léků

V kapitole 3.1.6 – Sféroidy je zmíněno, že zvířecí modely nejsou zcela výhodné, protože testování tak antiproliferativních léků na zvířatech by mohlo poskytovat nepravdivé údaje o jejich potenciálním účinku (Hutchinson & Kirk 2011, Sant & Johnston 2017). Ovšem v současné době jsou zvířecí modely stále považovány za jedinou akceptovatelnou preklinickou platformou agentur pro charakterizaci plného účinku dané protinádorové terapie (Costa et al. 2016).

Aplikace *in vitro* modelů (2D a 3D) pro hodnocení terapeutik však v posledních desetiletích roste. Fyziologický význam a výhody 3D buněčných modelů v porovnání s konvenčními 2D modely v biologii nádorového onemocnění a screeningu léků začínají být široce uznávány (Sant & Johnston, 2017). Ze získaných údajů z 3D nádorových sféroidů a z údajů získaných od pacientů s nádorovým onemocněním se ukázalo, že sféroidy jsou nejvhodnějším modelem *in vitro* k vyjádření vlastností solidních nádorů a k tomu ještě představují prostředí odolné vůči lékům ve srovnání s 2D buněčnou kulturou. Prozatímni nevýhodou přijetí sféroidních modelů při hledání nových protinádorových látek během preklinických studií je nedostatek technik při jejich generování (Costa et al. 2016).

Existují různé metody generování tkáňového sféroidu, ale prozatím neexistuje dohoda o používání standardní techniky pro jejich výrobu. Zejména tvorba vícečlánkových 3D sféroidů je náročná. Stejně tak existuje mnoho modelů pro růst buněk ve 3D. Každý model má ale své výhody a omezení vzhledem k podobnosti s různými aspekty růstu nádoru. Je tedy bezpodmínečně nutné vybrat vhodný model tak, aby se podobal specifickým vlastnostem nádorového onemocnění. Dohromady by pak 3D sféroidy přispěly spolehlivými informacemi k identifikaci a validaci cílů molekulárních léků, což by usnadnilo vývoj protinádorových léků (Chatzinikolaidou 2016).

4 Metodika

4.1 Materiál

Pro testování extraktů čeledi rostlin *Amaryllidaceae* byly použity buněčné linie střevního karcinomu Caco-2 a HT29. Tato buněčná linie byla zakoupena z American Type Culture Collection (ATCC). Kultivační media a Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM), fetální bovinní sérum (FBS), neesenciální aminokyseliny, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, roztok penicilínu (10 000 MJ) a streptomycinu (100 mg), zakoupeno od Biowest (Biowest, USA), 3-(Dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), trypsin, fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline -PBS), zakoupeno od Sigam - Aldrich (Sigma - Aldrich, CZ). Dymethylsulfoxid (DMSO) (Lachner, Neratovice CZ), Nunclon Sphera 96 jamková destička, 96 jamková mikrotitrační destička, serologické pipetety a kultivační láhve Nunc (ThermoFischer, UK).

4.2 Metodika

Alkaloidy použité v této práci, byly dodány farmaceutickou fakultou Univerzity Karlovy v Hradci Králové a jejich příprava byla již popsána dříve (Doskočil et al. 2015). Jako standart byl použit komerčně dostupný vinorelbin.

Tabulka 7: Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae* použité k testování.

Látka	Mr	Látka	Mr
Lykorin	287,315	Galanthamin	287,15
Haemanthidin	317,34	Tazettin	331,36
Haemanthamin	301,34	Montanin	301,34

Mr-relativní molekulová hmotnost.

4.2.1 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29 byly pěstovány v DMEM mediu s přidavkem 10% FBS, 1% roztoku penicilinu a streptomycinu, 1% pyruvátu sodného, 1% hydrogenuhličitanu sodného a 1% neesenciálních aminokyselin. Buněčná linie byla kultivována v kultivačních lahvích s 15 ml čerstvého media v CO₂ inkubátoru při 5 % CO₂ a 37 °C, přičemž medium bylo měněno každé dva dny. Celá kultivace buněk probíhala přibližně po dobu 7 dní do 80-90% konfluence. Při sklizni byla kultivační láhev propláchnuta 1 × pomocí PBS, aby došlo k odstranění inhibitorů trypsinu z media. Poté bylo na dobu 3 minut přidáno 5 ml trypsinu a po uplynutí výše uvedené doby bylo přidáno 5 ml kompletního media obsahující inhibitory trypsinu. V případě nekompletního uvolnění buněk z povrchu láhve byla použita buněčná škrabka. Následně byl obsah přepipetován do centrifugačních zkumavek, které byly centrifugovány po dobu 10 minut při 1063× RCF. Poté bylo slito staré medium bez poškození buněčné pelety, ke které bylo přidáno 5 ml čerstvého media a peleta v něm byla mechanicky rozpuštěna do rozvolnění jednotlivých buněk.

Následně bylo odebráno 100 µl buněčné suspenze a následně k tomu přidáno 100 µl tripanové modře. Následně byla koncentrace buněk analyzována na EVE™ automatické čtečce buněk (NanoEntek) Z původní buněčné suspenze byl odebrán 1 ml buněčné suspenze o koncentraci 1×10^5 a přidán do nové kultivační láhve s 15 ml čerstvého media a kultivační láhev následně opět kultivována. Zbylá suspenze se využívala pro přípravu sféroidů.

4.2.2 Cytotoxicita (MTT)

Cytotoxicita alkaloidů byla stanovena, jak již dříve popsal Doskočil et al. (2015). Připravená buněčná suspenze z buněk Caco-2 a HT29 o koncentraci $2,5 \times 10^3$ na ml média byla následně napipetováno do 96jamkové destičky objemu 200 µl a inkubováno 24h v CO₂ inkubátoru. Následně bylo přidáno 100 µl testovaných vzorků v koncentraci (10 — 0,312 µM). Vinorelbin byl testován v koncentracích (10 — 0,004 µM). Po 72h inkubace byly vzorky a médium odstraněny a nahrazeny za 100µ MTT v koncentraci v 1 mg/ml v DMEM a nechány dvě hodiny inkubovány při teplotě 37°C. Následně bylo MTT odstraněno a do destičky přidáno 100 µl DMSO. Absorbance byla měřena při 555 nm s použitím Tecan Infinite M200 spektrometru. Poté byla stanovena inhibiční koncentrace (IC₅₀) jednotlivých vzorků.

4.2.3 Příprava sféroidů

Založení sféroidů bylo provedeno podle Gupta et al. (2020) s modifikacemi. Zbývající suspenze byla naředěna na koncentraci 1×10^4 buněk na ml media, následně byla suspenze pipetována destiček Nunclon Sphera 96-well se speciální úpravou pro sféroidy o objemu 100 µl s výslednou koncentrací 1000 buněk na jamku. Následně byla takto připravená destička centrifugována na $400 \times g$ po dobu 5 minut s pomalým gradientem spomalování rotoru. Po ukončení centrifugace byla destička opatrně přemístěna do CO₂ inkubátoru a inkubována po dobu 72h.

Po 72h inkubace byla pořízena první série snímků sféroidů pomocí mikroskopu ZEISS Primovert (Carl Zeiss, objective, $10 \times /0.3$, kamera Color Axion), získané obrazy byly zpracovány v programu ZEN Blue software (Carl Zeiss) a označena jako čas 0. Následně k vzorku bylo 100 µl média s testovaným vzorkem, aby finální koncentrace byla 5, 2,5, 1,25 a 0,625 µM následně byla destička inkubována 48h. po této době byla pořízena další série fotek. Z destičky bylo odebráno 100 µl starého média a přidáno opět 100 µl nového média se vzorkem. Tento postup se opakoval následujících 10 dní. Jako kontrola byl vybrán vinorelbin v koncentraci 0,07, 0,039, 0,019 a 0,009 µM.

Získané fotografie byly analyzované pomocí programu Fiji ImagenJ a výpočet velikosti sféroidu byl založen na výpočtu dle Puhr et al. (2018):

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

Vzorek pro poloměr geometrického průměru.

$$= \frac{1}{2} (a \times b)^{1/2}$$

a,b jsou ortogonální průměry sféroidů.

4.3 Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí programu Graphpad Prism 9. Pro vyhodnocení byl použit dvoufaktorový test významnosti – ANOVA ($p \leq 0,05$). Získaná data byla vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka a následné post-hoc porovnání analyzováno pomocí Tukeyho testu.

5 Výsledky

5.1 Cytotoxicita (MTT)

V této diplomové práci byla testována na buněčných liniích kolorektálního karcinomu HT29 *in vitro* cytotoxická aktivita s celkem 5 připravenými analogy alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae*. Mezi testované alkaloidy patřil lykorin, haemanthidin, haemanthamin, montanin a vinorelbin. Všechny testované látky vykazovaly poměrně vysokou cytotoxickou aktivitu (Tabulka 8), ovšem mezi nejvýraznější patřil právě vinorelbin, který projevil cytotoxickou aktivitu při $IC_{50} 0,019 \pm 0,002 \mu M$. Vinorelbin se použil jako standart a je běžně využíván v léčbě nádorového onemocnění. Hned za ním s hodnotou $IC_{50} 1,80 \pm 0,43 \mu M$ byl montanin. Dalším derivátem s toxickým účinkem byl lykorin, přičemž u HT29 ($IC_{50} 2,34 \pm 0,41 \mu M$) vykazoval průměrnou hodnotu toxicity v porovnání s ostatními deriváty. Mezi testovanými deriváty s nejmenším projevem toxického účinku patřil haemanthidin ($IC_{50} 4,49 \pm 0,70 \mu M$) a haemanthamin ($IC_{50} 4,89 \pm 0,29 \mu M$).

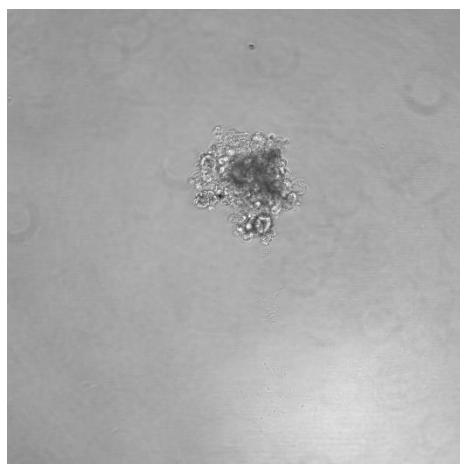
Tabulka 8: Výsledky stanovení toxicity.

Látka	HT29
	IC_{50} (μM)
Lykorin	$2,34 \pm 0,41$
Haemanthidin	$4,49 \pm 0,70$
Haemanthamin	$4,84 \pm 0,29$
Montanin	$1,80 \pm 0,43$
Vinorelbin	$0,019 \pm 0,002$

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD tří na sobě nezávislých opakování.

5.2 Účinek alkaloidů čeledi *Amaryllidaceae* na sféroidy

V rámci této práce jsme zjistili, že 3D model sféroidů vytvořený z buněčné linie Caco-2 nelze vytvořit. Po 3denní kultivaci nedošlo k vytvoření kompaktního sféroidu a při následné práci docházelo v 99 % k jejich samovolnému rozpadu nebo rozpadu během manipulace (Obrázek 6).



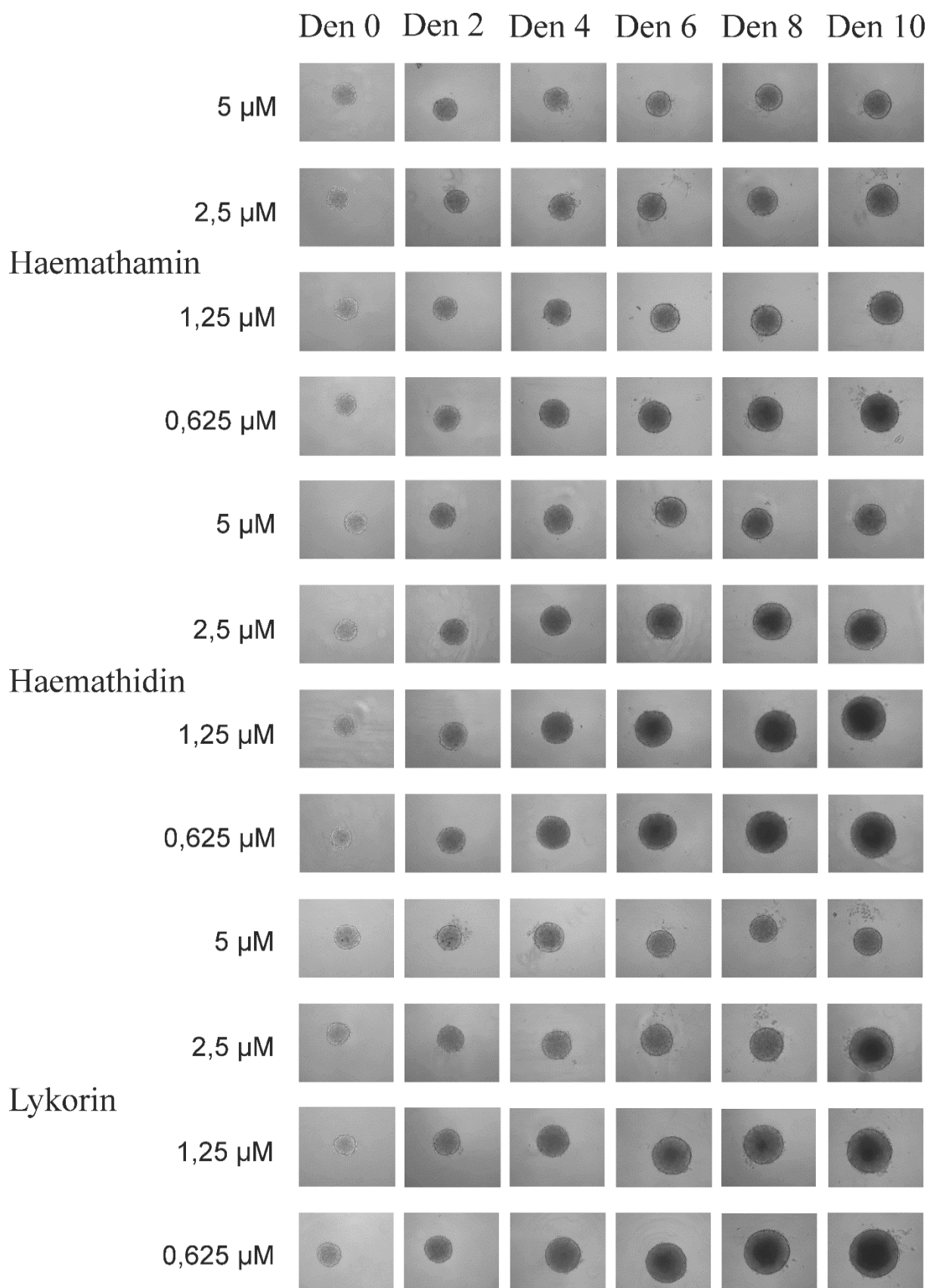
Obrázek 6: 3D sféroidy z buněčných linií kolorektálního karcinomu Caco-2, kde se po 3denní kultivaci nevytvořil kompaktní sféroid a při následné práci s nimi v 99 % došlo k jejich rozpadu.

U buněčné linie HT29 se naopak formovaly kompaktní sféroidy po celou dobu testu (Obrázek 7a, 7b). V rámci našeho testování jsme testovali 3 alkaloidy v koncentracích 5; 2,5; 1,25 a 0,625 μM . U všech námi testovaných látek v koncentraci 5 a 2,5 μM k prostupu testovaného alkaloidu do sféroidu došlo k zastavení nebo minimálně vyraznému zpomalení růstu sféroidů. Naproti tomu při koncentraci 1,25 μM byl u lykorinu a heamanthidinu sledován jen nepatrný vliv na růst sféroidů, přesto už se jednalo o statisticky významný rozdíl $p=0,001$, kde se v 10.dnu snížila velikost sféroidů v průměru o více jak 20 % a u koncentrace 0,625 μM růst nebyl takřka vůbec zpomalen.

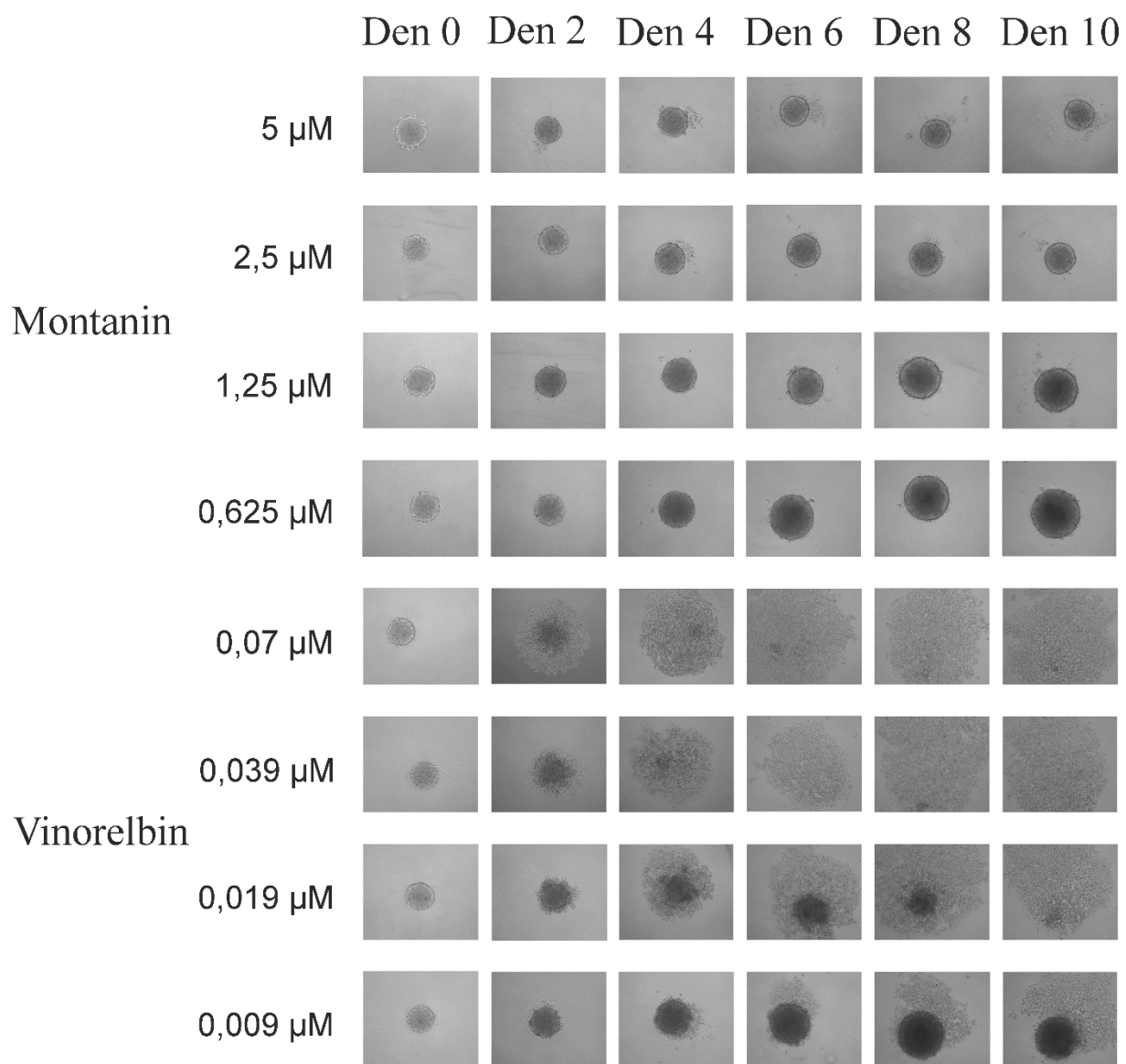
Na rozdíl od těchto dvou bylo u heamantaminu a montaninu při koncentraci 1,25 μM sledováno výraznější zpomalení růstu sféroidu v 10.dnu, a to až o 50 %, tudíž stejně jako u lykorinu a haemanthidinu došlo k statisticky významnému rozdílu $p=0,0001$.

Dokonce při koncentraci 0,625 μM v 10.dnu u montaninu a heamanthaminu byla rychlost růstu sféroidu silně omezena a testovaný alkaloid postupoval a zpomaloval buněčné dělení i při takto nízké koncentraci. Montanin se zmenšil až o 20 % a haemanthamin dokonce o 40 %, proto i zde došlo k statisticky významnému rozdílu $p=0,0001$.

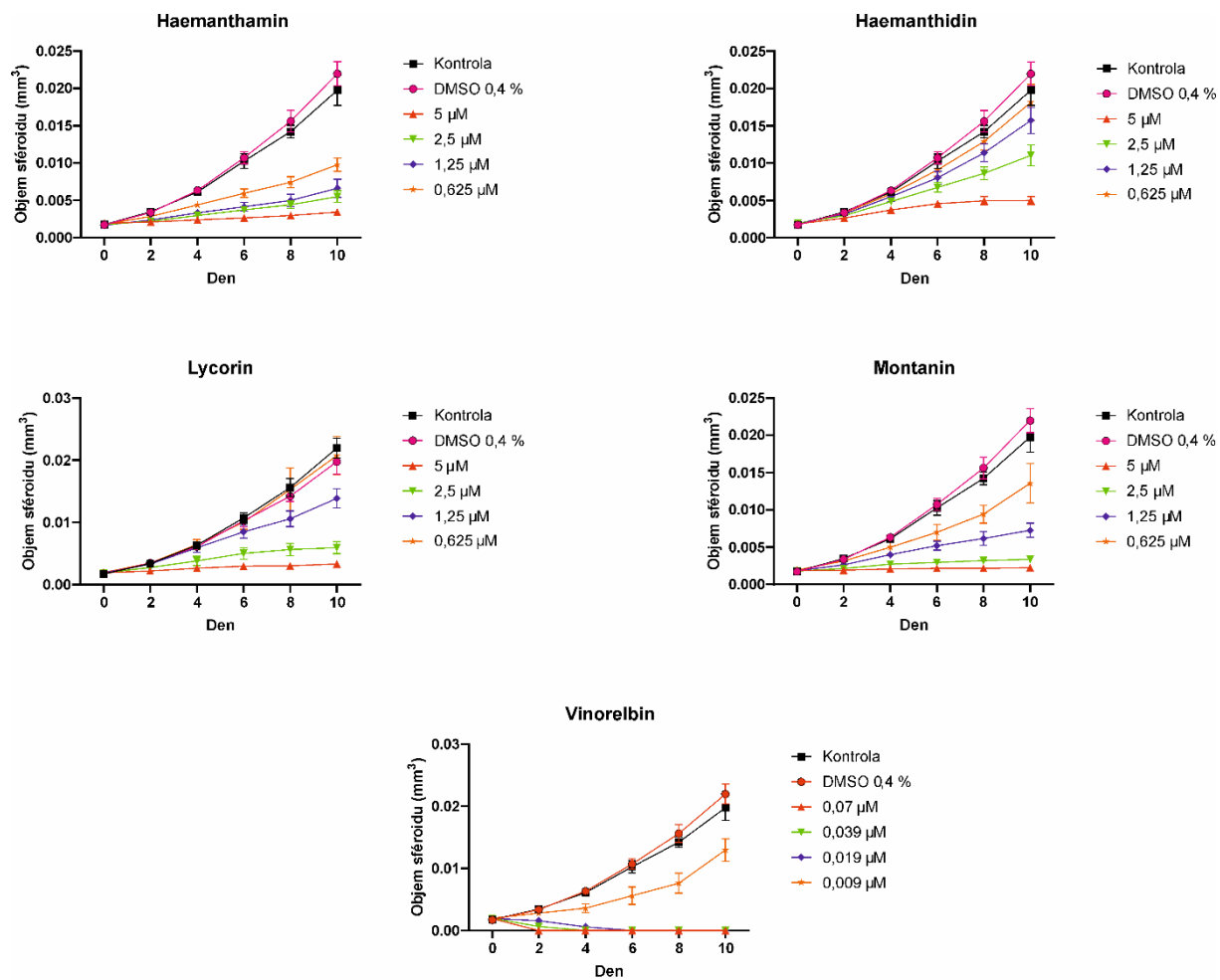
Jako standart jsme použili vinorelbin, alkaloid, který se běžně využívá při léčbě nádorových onemocnění plic, nikoliv však kolorektálního karcinomu, zde byl využit pro blízkou podobu testovaným látkám. Z předešlého testování toxicity jsme zjistili, že hodnota IC_{50} byla $0,019 \pm 0,002 \mu\text{M}$. Z tohoto důvodu byla použita koncentrace výrazně odlišná od zbytku testovaných látek. I při takto nízkých koncentracích vykazoval silnou aktivitu na sféroidy. Při koncentraci 0,078 μM došlo u sféroidů 2.den po přidání testované látky k jejich rozpadnutí (Obrázek 7b). U koncentrací 0,039 a 0,019 μM tento rozpad nastal do 4.dne po přidání testované koncentrace. U koncentrace 0,009 μM byl po první části sledování zastaven růst, obdobně jako u montaninu mezi 8. a 10.dnem, po přidání byl však zaznamenán statisticky významný nárůst objemu sféroidů. A však oproti velikosti sféroidu v kontrole byla velikost při dané koncentraci poloviční.



Obrázek 7a: Znárodnění růstu sféroidů v čase a v závislosti na koncentraci testované látky. Sféroidy tvořené buněčnou linií HT29 při použití 10 \times /0.3 objektivu.



Obrázek 7b: Znárodnění růstu sféroidů v čase a v závislosti na koncentraci testované látky. Sféroidy tvořené buněčnou linií HT29 při použití 10× /0.3 objektivu.



Obrázek 8: Grafické znázornění růstu 3D sféroidů tvořených buněčnou linií HT29 v závislosti na dávce a času. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Testované alkaloidy lycorinu, heamanthidinu, heamanthiminu, montaninu a vinorelbinu byly sledovány postupně 0, 2, 4, 6, 8 a 10 den před opětovným přidáním testovaných látek.

6 Diskuze

Nádorové onemocnění je celosvětově jedním z nejvýznamnějších problémů veřejného zdravotního systému a druhou hlavní příčinou úmrtí ve Spojených státech amerických (USA). Míra úmrtí na nádorové onemocnění rostla až do roku 1991. Naopak od 90.let 20.st. až do roku 2017 nepřetržitě klesala. Přesto jsou každoročně odhalovány velké počty úmrtí na nádorové onemocnění, zejména v USA (Siegel et al. 2020a), potažmo i zbytku světa Evropy nevyjímaje (Hofmarcher et al. 2020). Mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí na nádorové onemocnění je kolorektální karcinom (Siegel et al. 2020b), u něhož jsou nejaktuálnější způsoby léčby chirurgické zákroky, ozařování nebo chemoterapie. Často ale bývá preferována méně invazivní léčba, protože užíváním například chemoterapeutických činidel, které se sice zaměřují primárně na DNA nádorových buněk, ale projevují se mnoha vedlejšími účinky. Existuje tedy potřeba dalších terapeutických možností, které potlačí růst nádorových buněk s minimálním účinkem na zdravé buňky. Výzkumy poukázaly, že například přírodní produkty přispívají k vývoji nových léků pro léčbu a zvládnání chorob (Omoruyi et al. 2021).

Dlouhodobou a bohatou historii mají alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*, které představují pro vědce velmi cenný zdroj protinádorových účinků. Tento zájem o ně přetrvává hlavně díky silné cytotoxické aktivitě, kterou vykazují proti panelu nádorových buněk a naopak relativně nízkou cytotoxicitou k zdravým buňkám (Nair & Van Staden 2021). Jeden z prvních důkazů, které vykazují inhibici růstu a cytotoxicitu pro nádorové buňky *in vitro*, bylo hlášení o montaninu. Tento alkaloid pochází z montaninového typu alkaloidů *Amaryllidaceae* (AA) izolovaných z cibulí *Hippeastrum vittatum* v roce 2008. Od té doby se zaměřuje na jeho proliferační účinky a životaschopnosti na nádorových buňkách (Koutová et al. 2020).

Z námi testovaných vzorků na buněčných liniích kolorektálního karcinomu HT29 vykazoval toxicitu s hodnotou IC_{50} $1,80 \pm 0,43$ μ M právě montanin, jehož cytotoxicita je srovnatelná podle studie Al Shammari et al. (2020), kde toxicita montaninu odpovídá IC_{50} $1,35 \pm 0,47$ μ M na buněčných liniích HT29. V porovnání se starší studií dle Silva et al. (2008) se inhibiční aktivita růstu montaninu srovnávala s vittatinem také na buněčných liniích HT29 s hodnotou IC_{50} $0,71 \pm 0,10$ μ g/ml, což odpovídá necelým 5 μ M. Tyto výsledky vykazují výrazně vyšší koncentraci, než jsou naše a studie Al Shammari et al. (2020).

Jednou z produkcí AA montaninového typu je právě popis polosyntetické transformace kostry haemanthaminového typu na lešení montaninového typu (Koutová et al. 2020). Další námi testovaný vzorek na buněčných liniích HT29 byl haemanthamin (HAE) (IC_{50} $4,89 \pm 0,29$ μ M) a haemanthidin (HAD) (IC_{50} $4,49 \pm 0,70$ μ M). V rámci našich testovaných alkaloidů se ukazují jako hodnoty s nejnižším projevem toxicity. Dle Cahlíková et al. (2021) jsou HAE a HAD haemanthaminového typu strukturně velmi podobné. HAD se izoluje z rostlin spíše jako izomer v porovnání s HAE, který se izoluje jako alkaloid a vyznačuje se silnou inhibiční a cytotoxickou aktivitou proti širokému spektru nádorových buněčných linií, včetně HT29. Již ve studii Havelek et al. (2017) při *in vitro* testování buněčné linie HT29 vykazoval HAE silnou toxicitu (IC_{50} 0.3 ± 0.1 μ M).

Podobnou toxicitu HAE testovaného také na bunčkách HT29 představuje studie Doskočil et al. (2015), zde jsou hodnoty IC_{50} $0,59 \pm 0,01 \mu\text{M}$. Dále byla také toxicita stanovena u dalších alkaloidů, stejně jako v naší studii. Jednalo se hlavně o HAD, lykorin a vinorelbin. Naproti tomu ve studii dle Luo et al. (2012) měl HAE hodnotu IC_{50} $2,1 \mu\text{M}$. Tato hodnota toxicity HAE byla o $0,3 \mu\text{M}$ menší než u námi testovaného lykorinu.

Dalším testovaným vzorkem byl lykorin. Jedná se o pyrrolo [*de*] fenantridinový alkaloid extrahovaný z čeledi *Amaryllidaceae* vykazující širokou škálu fyziologických účinků, včetně potenciálního protinádorového účinku (Habartová et al. 2016). Byla také sledována inhibiční aktivita *in vitro* na HT29, jejíž hodnota IC_{50} se pohybovala kolem $3,2 \pm 0,0 \mu\text{M}$ (Khalifa et al. 2018). Námi testovaný lykorin vykazoval inhibiční aktivitu i proti buněčné linii HT29 (IC_{50} $2,34 \pm 0,41 \mu\text{M}$). V již zmíněné studii Doskočil et al. (2015) byl také testován alkaloid lykorin s hodnotou IC_{50} $1,2 \pm 0,00 \mu\text{M}$. Mimo jiné Doskočil et al. (2015) také testoval toxicitu na buněčných liniích kolorektálního karcinomu Caco-2 s alkaloidy HAE (IC_{50} $0,99 \pm 0,14 \mu\text{M}$), HAD (IC_{50} $3,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$), lykorinu (IC_{50} $0,99 \pm 0,08 \mu\text{M}$) a vinorelbinu (IC_{50} $0,03 \pm 0,00 \mu\text{M}$). Z této studie vyplývá, že testované alkaloidy vykazují velmi účinný cytotoxický potenciál proti oběma testovaným buněčným liniím.

V těchto případech se jedná většinou o výsledky získané pomocí klasických 2D metod, které však nepodávají přesné informace o účinnosti dané látky. K takto podrobnějšímu testování jsou vhodnější 3D modely využívající organoidy nebo sféroidy, které byly a jsou silně prosazovány jako kultivační technika namísto tradiční 2D buněčné kultury, která zajišťuje, že jsou všechny buňky kultivovány za stejných podmínek. Avšak růstový režim 2D kultury se liší od stereoskopického prostředí těla a to vede ke zjevným rozdílům v morfologii buněk, diferenciaci, jejich vzájemným interakcím a chování ve srovnání s fyziologickými podmínkami *in vivo*. Díky jejich jednoduchosti, reprodukovatelnosti a podobnosti s fyziologickými tkáněmi, mají sféroidy široké uplatnění v oblastech vývoje léků a screeningu. Nicméně vzhledem k vlivu kultivačních metod a jejich vlastnostem mají tradiční kultivační metody buněčných sféroidů četné vady, včetně poškození buněk způsobeného tlakem kapaliny, nízkým výtěžkem a nekontrolovatelnou velikostí buněk (Shao et al. 2020).

Námi tvořené sféroidy jsme vytvořili kultivací buněčných linií kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29 a kultivovali se v DMEM. Nejprve jsme zkusili, zda tyto buněčné linie vůbec dokážou sféroid vytvořit. Po 72 hodinách inkubace jsme nafotili první sérii snímků označených jako Den 0. V případě Caco-2 se nevytvořily dostatečně pevné vazby, a proto se sféroid při jakékoli následující práci rozpadal. Důvod, proč buněčné linie Caco-2 nedokázali vytvořit kompaktní sféroid, bude nejspíš ve způsobu metody kultivace, protože studie od Samy et al. (2019), Eilenberger et al. (2021) a Gheyntanči et al. (2021) vykazují, že kompaktní sféroid lze vytvořit. Kompaktní sféroid také vytvořily buněčné linie HT29, které se následujícím testováním po dobu 10 dnů nerozpadly. Vyjimku tvořil pouze námi testovaný vinorelbin, který dokázal sféroid HT29 v důsledku jeho expozice úplně rozpustit. Právě stanovení koncentrace je jeden z významných faktorů, které ovlivňují růst sféroidů a stejně tak je uvedeno ve studii Thakuri et al. (2019a). U vinorelbinu se používaly odlišné koncentrace v porovnání s ostatními testovanými látkami. Až při koncentraci $<0,009 \mu\text{M}$ způsoboval omezení růstu HT29 sféroidu. Přesto jsme i zde pozorovali od 8. do 10.dne trend, kdy se ze sféroidu začaly uvolňovat jednotlivé buňky a je tedy pravděpodobné, že by při dlouhodobější expozici i zde došlo k pozvolnému rozpadu.

Ve studii tedy podle Thakuri et al. (2019a), která také využila konvenční techniku, jako je tekuté překrytí a mikrotitrační destičky, nevykazovala vždy konzistentní sféroidy. Tento nekonzistentní tvar potom může ovlivňovat reprodukovatelnost testovaných látek. Po určité časové období by sféroidy měly vykazovat růst, který je zapříčinený buněčnou proliferací, a zároveň je to jeden z kvantitativních ukazatelů velikosti sféroidů. Následně byla prováděna analýza s přidáním biochemických činidel či jakékoliv jiné testované látky, kde lze v průběhu času a na základě zvolené metody analýzy pozorovat velikost sféroidů oproti biochemickým testům, které by vyžadovaly novou sadu sféroidů v každém časovém bodě. Zajímavé je, že hypoxické nebo nekrotické jádro může ovlivňovat růst sféroidu, ale velikost sféroidu je závislá na velikosti tohoto účinku. U relativně malého objemu sféroidů bude tento účinek minimální. Jeden ze zmíněných významnějších důvodů, který by mohl ovlivňovat růst sféroidů je koncentrace testovaných látek. V této studii se jednalo o testování speciálních kiazozových molekulárních inhibitorů, kde právě trametinib byl neúčinnější proti sféroidům z buněčné linie HT29 až při nízkých nanomolárních koncentracích <10 nM. Nad touto koncentrací byly pak sféroidy „načechranější“ nebo se rozpadly. Stejně jako v našem případě Caco-2. Jedná se o to, že buňky se začnou uvolňovat a vytvoří sféroid s nekruhovými hranami, což ukazuje rozpad buněk v důsledku expozice léku. Od stejného autora vznikly ten samý rok další studie se stejným principem. Ovšem testují se zde jiné látky a sféroidy se tvoří z jiných kultur kolorektálního karcinomu. Jedná se například o studie Thakuri et al. (2019b) a Thakuri et al. (2019c), které poukazují na to, že velikost sféroidů v průběhu času silně koreluje s metabolickou aktivitou buněk.

Kvůli podobnému epiteloidnímu fenotypu mohou buněčné linie HT29 a Caco-2 vykazovat odlišné fenotypové a molekulové vlastnosti v podmínkách *in vivo* a *in vitro*. HT29 jsou buňky invazivní a metastatické *in vivo*, ale ne *in vitro*, zatímco buňky Caco-2 jsou neinvazivní. Na základě těchto bodů bylo cílem stanovit odlišné biologické rysy dvou různých typů kolosfér odvozených z buněčných linií kolorektálního karcinomu (Gheytañchi et al. 2021). V této studii se sféroidy snažily vytvořit v nepřilnavém stavu na misky potažené poly-HEMA při různých hustotách buněk. Obě buněčné linie sféroid nevytvořily, proto se použila metoda zavěšené kapky pro HT29 a volně plovoucí kultura v neadherentním stavu pro Caco-2, kde po 4 dnech kultivace vykazovaly HT29 větší objem v průměru $82,52 \pm 22,56 \mu\text{m}$ než Caco-2 ($66,9 \pm 14,88 \mu\text{m}$). Kompaktní sféroidy představují pro vědce výzvu v zobrazování a distribuci léků. Na druhou stranu sféroidy vzniklé z volně uspořádaných buněk, jako to bylo v naší studii, vyžadují zvláštní péči při manipulaci, protože mají tendenci se rozpadnout. Ačkoli sféroidy představují lepší znázornění fyziologických přechodů a buněčnou heterogenitu nádoru *in vivo*, na základě jejich nedostatečné vaskularity mohou sféroidy představovat při testování penetrace léčiv nedostatečné napodobení podmínek nádoru *in vivo*.

U kompaktního sféroidu z buněk Caco-2 je důležité zohlednit způsob jejich kultivace. Mohl by to být jeden z možných faktorů, který ovlivňuje jejich tvorbu. Pro kultivaci sféroidů je použito mnoho různých metod, včetně destiček s nízkou adhezí, zavěšovací kapka či strategie založené na tzv. scaffoldu neboli lešení. Ovšem nakonec se ukázalo, že studie Samy et al. (2019) vyvinula novou techniku zvanou Sacrificial Micromolding pro geometrickou kultivaci sféroidů Caco-2, které jsou schopny lumenizovat a polarizovat se po pouhých 6 dnech kultivace.

Nicméně tyto vytvořené sféroidy nebyly charakterizovány, včetně jejich bariérové funkce, potenciálních změn buněčného fenotypu a transportní funkce v 3D mikroprostředí. Charakterizace je velmi důležitá především z pohledu screeningu léků či studie biologie epitelu. Přesto sféroidy kultivované pomocí metody Sacrificial Micromolding vykazují reprodukovatelné rysy a funkce, které jsou více reprezentativní pro tenké střevo v *in vivo* podmínkách. Dále bylo dokázáno, že polarizace a zrání buněk jsou rychlejší a jejich životaschopnost je delší ve sféroidech než na monovrstvě 2D buněčných modelů.

Další možností tvorby sféroidů je podle studie Li et al. (2018), Vadivelu et al. (2017), Rycheký et al. (2017) metoda pomocí takzvaných tekutých kuliček. Jedná se o tekutou kapku zapouzdřenou hydrofobním práškem, která má díky svým vlastnostem uplatnění v mnoha oblastech, například jako senzory plynu, mikroreaktory nebo bioreaktory pro kultivaci buněk. Během kultivace v médiu uvnitř kapalných kuliček vytvářely buňky sféroidy bez nutnosti podpůrného lešení. Tento typ 3D sféroidů se používá pro testování chování solidních nádorů. A to je důvodem, proč se u solidních nádorů uvnitř sféroidů s jejich rostoucí velikostí vyvíjí nekrotické jádro, které omezuje difúzi živin a kyslíku do jádra a buňky začínají odumírat. Námi testované 3D sféroidy byly také vytvořeny bez potřeby lešení, a proto například nekrotické jádro vykazoval testovaný montanin, lykolin a haemanthidin při koncentraci 0,625 μM v 10. dnu (Obrázek 7a, 7b). Výše zmíněná metoda tekutých kuliček byla jedna z prvních, která představila tekuté kuličky pro stanovení optimálních podmínek tvorby sféroidů kultivací kolorektálního karcinomu HT29. Kvůli snadnější manipulaci a sklizni sféroidů se použily kuličky o objemu 100 μl s 10 000 naočkovaných buněk. Jejich růst byl pak zaznamenán v různých časech. V našem případě jsme zaznamenávali růst sféroidů v čase 0., 2., 4., 6., 8. a 10. den, kdy se objem sféroidů v průběhu času zmenšoval, až zastavil. Další výzva této studie bude testování dalších sféroidů v jejich přípravě uniformní velikosti, a proto se i zde pokusíme o kokultivaci dvou buněčných linií ve formě sféroidů uvnitř tekutých kuliček, jako tomu je u studie Eilenberger et al. (2021).

Následující studie Raileanu et al. (2020) se také snažila stanovit optimální podmínky pro tvorbu sféroidů HT29 a zhodnotit hustotu buněk. My jsme vytvořili sféroidy při hustotě 1000 buněk na jamku a nechali jsme to inkubovat 72 hodin. Po 72 hodinách jsme pořídili první snímek sféroidů a označili je jako Den 0. Při hustotě 1000 a 2500 buněk na jamku lze velikost sféroidů pozorovat od 4.dne. Ovšem nejlepší růst sféroidy vykazovaly až při hustotě 5000 buněk na jamku, kde po 48 hodinách byla velikost sféroidů vytvořená a neustále se zvětšovala. Následně se testoval cytotoxický účinek pomocí testu MTT u doxorubicinu (Doxo) a gramicidinu (GA) na sféroidech HT29 a stejně jako v naší studii se na základě aplikovaných koncentrací sledoval růst jejich objemu. Výsledkem studie bylo, že Doxo a GA lze při samostatném používání označit, jako chemoterapeutická činidla proti HT29 sféroidům, protože úspěšně snižují životaschopnost buněk a také vyčerpávají buněčnou energii.

Ačkoliv je zapotřebí více studií, abychom lépe porozuměli tvorbě, charakteristice a vlastnostem sféroidů, naše data vykazují, že při testování AA se mohou stát platnou strategií v léčbě nádorového onemocnění přinejmenším u buněk HT29.

7 Závěr

V rámci této práce byla testována na buněčných liniích kolorektálního karcinomu HT29 *in vitro* cytotoxická aktivita alkaloidů z čeledi *Amaryllidaceae* a vinorelbinem jako standartem. Vzorky byly nejdříve testovány pomocí klasické 2D metody využívající tetrazol bromid. Následně byly vytvořeny 3D sféroidy a na nich byly testované látky v příslušných koncentracích po dobu 10 dní.

Výsledky 2D a 3D toxicity jsou od sebe rozdílné. Přestože měl lycorin relativní cytotoxicitu a hlásí ji i další studie, nebyl schopný výrazně inhibovat růst sféroidů při nižších koncentracích. Na rozdíl od toho montanin s hemanthaminem vykazovaly zpomalení růstu i při nízkých koncentracích.

Nejzajímavější výsledek byl však dosažen u standartu. Ten rozpouštěl koncentrace zcela a při koncentraci 9 nM byl zaznamenán trend, při kterém se z něho od 8.dne začaly uvolňovat jednotlivé buňky. Předpokládáme, že při dlouhodobějším sledování, které by trvalo déle než pouhých 10 dnů, by došlo k postupnému rozpadu sféroidů v dané koncentraci.

Na tuto variantu by bylo vhodné se zaměřit i do budoucna a sledovat tak, co udělají testované látky v dlouhodobém časovém horizontu se stabilitou zmíněných sféroidů.

8 Literatura

- Abbas N, Mohamad D. 2014. Automatic color nuclei segmentation of leukocytes for acute leukemia. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology* **7**: 2987–2993.
- Al Shammari L, Al Mamun A, Koutová D, Majorošová M, Hulcová D, Šafratová M, Breiterová K, Maříková J, Havelek R, Cahlíková L. 2020. Alkaloid profiling of *Hippeastrum* cultivars by GC-MS, isolation of Amaryllidaceae alkaloids and evaluation of their cytotoxicity. *Rec. Nat. Prod* **14**:154–159.
- Anttila JV, Shubin M, Cairns J, Borse F, Guo Q, Mononen T, Vázquez-García I, Pulkkinen O, Mustonen V. 2019. Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLOS Computational Biology* (e1007493) DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007493.
- Aponte-López A, Fuentes-Pananá EM, Cortes-Muñoz D, Muñoz-Cruz S. 2018. Mast Cell, the Neglected Member of the Tumor Microenvironment: Role in Breast Cancer. *Journal of Immunology Research* **2018**: 1-11.
- Arends J et al. 2017. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clinical Nutrition* **36**: 11-48.
- AU - Foty R. 2011. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *JoVE* 51 (e2720) DOI: 10.3791/2720.
- Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. 2019. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism* **92**: 121–135.
- Baker BM, Chen CS. 2012. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science* **13**: 3015–3024.
- Balkwill F, Mantovani A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *The Lancet* **9255**: 539–545.
- Barnes JL, Zubair M, John K, Poirier MC, Martin FL. 2018. Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions* **5**: 1213–1224.
- Basu A. 2018. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International Journal of Molecular* **19**: 1–13.
- Baum RA, Manda D, Brown CM, Anzeljc SA, King MA, DUBY J. 2018. A Learning Collaborative Approach to Improve Mental Health Service Delivery in Pediatric Primary Care. *Pediatric Quality & Safety* (e119–e119) DOI: 10.1097/pq9.000000000000119.
- Birkett N, Al-Zoughool M, Bird M, Baan RA, Zielinski J, Krewski D. 2019. Overview of biological mechanisms of human carcinogens. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **22**: 288–359.
- Boobis AR, Cohen SM, Dellarco VL, Doe JE, Fenner-Crisp PA, Moretto A, Pastoor TP, Schoeny RS, Seed JG, Wolf DC. 2016. Classification schemes for carcinogenicity based on hazard-identification have become outmoded and serve neither science nor society. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **82**: 158–166.
- Borriello L, Karagiannis GS, Duran CL, Coste A, Oktay MH, Entenberg D, Condeelis JS. 2020. The role of the tumor microenvironment in tumor cell intravasation and dissemination. *European Journal of Cell Biology* **99**: 151098.
- Brauchle E, Kasper J, Daum R, Schierbaum N, Falch C, Kirschniak A, Schäffer TE, Schenke-Layland K. 2018. Biomechanical and biomolecular characterization of extracellular matrix structures in human colon carcinomas. *Matrix Biology* **68–69**: 180–193.
- Breslin S, O’Driscoll L. 2013. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today* **18**: 240–249.

- Brodowska-Kania D, Kotwica E, Paturej A, Sośnicki W, Patera J, Gizewska A, Niemczyk S. 2016. What do we know about pulmonary blastoma?: review of literature and clinical case report. *Nagoya Journal of Medical Science* **78**: 507.
- Butler T, Gullino P. 1975. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer research* **35**: 512-516.
- Cahlíková L, Kawano I, Řezáčová M, Blunden G, Hulcová D, Havelek R. 2020. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochemistry Reviews* **20**: 303–323.
- Cahlíková L, Kawano I, Řezáčová M, Blunden G, Hulcová D, Havelek R. 2021. The Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine, haemanthidine and their semisynthetic derivatives as potential drugs. *Phytochemistry Reviews* **20**: 303–323.
- Cai Z, Wang C, Yang W. 2016. Role of berberine in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **12**: 2509.
- Campbell PJ et al. 2020. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature* **578**: 82-93.
- Casali PG, Dei Tos AP, Gronchi A. 2020. When does a new sarcoma exist? *Clinical Sarcoma Research* **10**: 19.
- Cesare D, De Sacco C, Tomei F, Massimi R, Suppi A, Ricci S, Marchione S, Buomprisco G, Lorusso G, Marzio AD. 2017. Risk assessment: carcinogenic and mutagenic agents **100**: 9–20.
- Cicero AFG, Baggioni A. 2016. Berberine and its role in chronic disease. *Anti-Inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*, Springer.
- Cimmino A, Masi M, Evidente M, Superchi S, Evidente A. 2017. Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity. *Chirality* **29**: 486–499.
- Cohen SM, Boobis AR, Dellarco VL, Doe JE, Fenner-Crisp PA, Moretto A, Pastoor TP, Schoeny RS, Seed JG, Wolf DC. 2019. Chemical carcinogenicity revisited 3: Risk assessment of carcinogenic potential based on the current state of knowledge of carcinogenesis in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **103**: 100–105.
- Connor J. 2017. Alcohol consumption as a cause of cancer. *Addiction* **112**: 222–228.
- Cooper GM. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Washington, D.C.: Sunderland, Mass.: ASM Press; Sinauer Associates, United States.
- Cortes N, Alvarez R, Osorio EH, Alzate F, Berkov S, Osorio E. 2015. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **102**: 222–228.
- Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 2016. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, **34**: 1427–1441.
- Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. 2013. Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy* **107**: 701–708.
- De la Torre BG, Albericio F. 2020. The Pharmaceutical Industry in 2019. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. In *Molecules* **25**: 745.
- Desgagné-Penix I. 2020. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. *Phytochemistry Reviews* **20**: 409–431.
- Ding Y, Qu D, Zhang KM, Cang XX, Kou ZN, Xiao W, Zhu JB. 2017. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* **19**: 53–100.
- Đorđević S, Šarčević-Todosijević L, Popović V, Perić M, Živanović L, Đorđević N, Stevanović A. 2020. Health Safe Food-Risk of Carcinogenic Substances. *Health Safe Food - Risk of Carcinogenic Substan*, Novi Sad, Serbia.

- Doskočil I, Hošťálková A, Šafratová M, Benešová N, Havlík J, Havelek R, Kuneš J, Královec K, Chlebek J, Cahlíková L. 2015. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters* **13**: 394–398.
- 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.
- Edmunds LR, Sharma L, Kang A, Lu J, Vockley J, Basu S, Uppala R, Goetzman ES, Beck ME, Scott D, Prochownik EV. 2014. c-Myc programs fatty acid metabolism and dictates acetyl-CoA abundance and fate. *The Journal of Biological Chemistry* **289**: 25382–25392.
- Eglen RM, Klein JL. 2017. Three-Dimensional Cell Culture: A Rapidly Emerging Approach to Cellular Science and Drug Discovery. *SLAS Discovery : Advancing Life Sciences R & D* **22**: 453–455.
- Eilenberger C, Rothbauer M, Selinger F, Gerhartl A, Jordan C, Harasek M, Schädl B, Grillari J, Weghuber J, Neuhaus W, Küpcü S, Ertl P. 2021. A Microfluidic Multisize Spheroid Array for Multiparametric Screening of Anticancer Drugs and Blood–Brain Barrier Transport Properties. *Advanced Science* DOI: 10.1002/advs.202004856.
- El Tahchy A, Bordage S, Ptak A, Dupire F, Barre E, Guillou C, Henry M, Chapleur Y, Laurain-Mattar D. 2011. Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **106**: 381–390.
- El Zoghbi M, Salameh P, Stücker I, Brochard P, Delva F, Lacourt A. 2017. Absence of multiplicative interactions between occupational lung carcinogens and tobacco smoking: a systematic review involving asbestos, crystalline silica and diesel engine exhaust emissions. *BMC Public Health* **17**: 156.
- Feng X, Sureda A, Jafari S, Memariani Z, Tewari D, Annunziata G, Barrea L, Hassan STS, Šmejkal K, Malanik M. 2019. Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: from mechanisms to therapeutics. *Theranostics* **9**: 1923.
- Ferdausi A, Chang X, Hall A, Jones M. 2020. Galanthamine production in tissue culture and metabolomic study on Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. *Industrial Crops and Products* **144**: 112058.
- Ferreira LP, Gaspar VM, Mano JF. 2018. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects. *Acta Biomaterialia*, **75**: 11–34.
- Floyd E, McShane T. 2004. Development and use of biomarkers in oncology drug development. *Toxicologic pathology* **32**: 106-115.
- Gandomani HS, Aghajani M, Mohammadian-Hafshejani A, Tarazoj AA, Pouyesh V, Salehiniya H. 2017. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomedical Research and Therapy* **4**:1656–1675.
- Gapstur SM, Drope JM, Jacobs EJ, Teras LR, McCullough ML, Douglas CE, Patel AV, Wender RC, Brawley OW. 2018. A blueprint for the primary prevention of cancer: Targeting established, modifiable risk factors. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**: 446–470.
- Gheytanchi E, Naseri M, Karimi-Busheri F, Atyabi F, Mirsharif ES, Bozorgmehr M, Ghods R, Madjd Z. 2021. Morphological and Molecular Characteristics of Spheroid Formation in HT-29 and Caco-2 Colorectal Cancer Cell Lines **21**:204.
- Goodman 2021. Cell Cycle and Cancer. Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-817927-7.00010-7.
- Gupta PK. 2020. Chemical Carcinogenesis. In *Problem Solving Questions in Toxicology*, Springer Cham.
- Habartová K, Cahlíková L, Řezáčová M, Havelek R. 2016. The Biological Activity of Alkaloids from the Amaryllidaceae: From Cholinesterases Inhibition to Anticancer Activity. *Natural Product Communications* **11**: 1587-1594.

- Habtemariam S. 2020. The Quest to Enhance the Efficacy of Berberine for Type-2 Diabetes and Associated Diseases: Physicochemical Modification Approaches. *Biomedicines* **8**: 90.
- Hait WN. 2010. Anticancer drug development: the grand challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**: 253–254.
- Harada T, Sukoh N, Hakuma N, Kamimura A, Ito K, Okamoto K. 2006. Pulmonary blastoma within bronchioloalveolar cell carcinoma. *Respirology* **11**: 339–342.
- Harris CC. 2018. Tobacco smoking, E-cigarettes, and nicotine harm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**: 1406–1407.
- Havelek R, Muthna D, Tomsik P, Kralovec K, Seifrtova M, Cahlikova L, Hostalkova A, Safratova M, Perwein M, Cermakova E, Rezacova M. 2017. Anticancer potential of Amaryllidaceae alkaloids evaluated by screening with a panel of human cells, real-time cellular analysis and Ehrlich tumor-bearing mice. *Chemico-Biological Interactions* **275**: 121–132.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. 2020. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **38**: 167–197.
- Hecht S, Park SL, Carmella S, Stram D, Haiman C, Le Marchand L, Murphy S, Yuan JM. 2017. Tobacco Carcinogens and Lung Cancer Susceptibility. *Journal of Thoracic Oncology* **12**: 19–20.
- Hecht SS. 2002. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *The Lancet Oncology* **3**: 461–469.
- Hofmanová J. 2013. Genotoxicita a karcinogenze. Masarykova univerzita, Brno.
- Hofmarcher T, Lindgren P, Wilking N, Jönsson B. 2020. The cost of cancer in Europe 2018. *European Journal of Cancer* **129**: 41–49.
- Hopkins BD, Goncalves MD, Cantley LC. 2016. Obesity and Cancer Mechanisms: Cancer Metabolism. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **34**: 4277–4283.
- Huang LK, Chao SP, Hu CJ. 2020. Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *Journal of Biomedical Science* **27**: 18.
- Hunt JA, Chen R, Van Veen T, Bryan N. 2014. Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry B* **2**: 5319–5338.
- Hussain A, Dulay P, Rivera MN, Aramouni C, Saxena V. 2019. Neoplastic Pathogenesis Associated with Cigarette Carcinogens. *Cureus* (e3955–e3955) DOI: 10.7759/cureus.3955.
- Hutchinson L, Kirk R. 2011. High drug attrition rates—where are we going wrong? *Nature Reviews Clinical Oncology* **8**:189–190.
- Chang Y, Di Tomaso E, McDonald D, Jones R, Jain R, Munn L. 2000. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 14608-14613.
- Chatzinikolaidou M. 2016. Cell spheroids: the new frontiers in in vitro models for cancer drug validation. *Drug Discovery Today* **21**: 1553–1560.
- Che L, Lei Z, Wu P, Song D. 2019. A 3d printable and bioactive hydrogel scaffold to treat traumatic brain injury. *Advanced Functional Materials* **29**: 1904450.
- Chen DS, Mellman I. 2017. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nature* **541**: 321–330.
- Chen JJ, Lu TP, Chen YC, Lin WJ. 2015. Predictive biomarkers for treatment selection: statistical considerations. *Biomarkers in Medicine* **9**: 1121–1135.
- Cheng YT, Yang CC, Shyur LF. 2016. Phytomedicine—Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacological Research* **114**: 128–143.

- Ijaz S, Ullah A, Shaheen G, Jahan S. 2020. Exposure of BPA and its alternatives like BPB, BPF, and BPS impair subsequent reproductive potentials in adult female Sprague Dawley rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* **30**: 60–72.
- Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. 2019. Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review. *Phytotherapy Research* **33**: 504–523.
- Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ, Hudis CA. 2016. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **34**: 4270–4276.
- Jensen C, Teng Y. 2020. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences* **7**: 1–15.
- Joseph JS, Malindisa ST, Ntwasa M. 2018. Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culturing in drug discovery. *Cell Culture* **2**: 1–22.
- Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2018. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science: AMS* **14**: 910.
- Karagueuzian HS, White C, Sayre J, Norman A. 2012. Cigarette smoke radioactivity and lung cancer risk. *Nicotine & Tobacco Research : Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* **14**: 79–90.
- Kashima H, Noma K, Ohara T, Kato T, Katsura Y, Komoto S, Sato H, Katsube R, Ninomiya T, Tazawa H, Shirakawa Y, Fujiwara T. 2019. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote the lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* **144**: 828–840.
- Khalifa MF, Attia EZ, Fahim JR, Kamel MS. 2018. An overview on the chemical and biological aspects of lycorine alkaloid. *Journal of Advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences* **1**: 41–49.
- Khumkhong P, Piboonprai K, Chaichompoo W, Pimtong W, Khongkow M, Namdee K, Jantimaporn A, Japrungr D, Asawapirom U, Suksamrarn A, Iempridee T. 2019. Crinamine Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation, Migration, and Angiogenesis in Cervical Cancer SiHa Cells. In *Biomolecules* DOI: 10.3390/biom9090494.
- Kitamura H, Motohashi H. 2018. NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer Science* **109**: 900–911.
- Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. 2015. Immune cell promotion of metastasis. *Nature Reviews Immunology* **15**: 73–86.
- Klaunig JE, Wang Z. 2018. Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology* **7**: 116–121.
- Klein WMP, Jacobsen PB, Helzlsouer KJ. 2020. Alcohol and Cancer Risk: Clinical and Research Implications. *JAMA* **323**: 23–24.
- Koutová D, Maafi N, Havelek R, Opletal L, Blunden G, Řezáčová M, Cahlíková L. 2020. Chemical and Biological Aspects of Montanine-Type Alkaloids Isolated from Plants of the Amaryllidaceae Family. In *Molecules* DOI: 10.3390/molecules25102337.
- Ksouri R. 2019. Food components and diet habits: chief factors of cancer development. *Food Quality and Safety* **3**: 227–231.
- Kulasingam V, Prassas I, Diamandis EP. 2017. Towards personalized tumor markers. *Npj Precision Oncology* **1**: 17.
- Kydd J, Jadia R, Velpurisiva P, Gad A, Paliwal S, Rai P. 2017. Targeting strategies for the combination treatment of cancer using drug delivery systems. *Pharmaceutics* **9**: 46.
- Laking GR. 2019. Human Exposure to Radioactivity From Tobacco Smoke: Systematic Review. *Nicotine & Tobacco Research* **21**: 1172–1180.

- Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. 2016. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine* **375**: 794–798.
- LeBleu VS, Kalluri R. 2018. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Disease Models & Mechanisms* **11**: 1-9.
- Lee MTG, Chiu CC, Wang CC, Chang CN, Lee SH, Lee M, Hsu TC, Lee CC. 2017. Trends and Outcomes of Surgical Treatment for Colorectal Cancer between 2004 and 2012- an Analysis using National Inpatient Database. *Scientific Reports* **7**: 2006.
- Li X, Shi H, Wang Y, Wang R, Huang S, Huang J, Geng X, Zang D. 2018. Liquid shaping based on liquid pancakes. *Advanced Materials Interfaces* **5**: 1701139.
- Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi VD, Mohd MA, Moon HB, Nakata H, Kannan K. 2012. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environmental Science & Technology* **46**: 6860–6866.
- Ligibel JA et al. 2014. American Society of Clinical Oncology position statement on obesity and cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**: 3568–3574.
- Liu W, Le A, Hancock C, Lane AN, Dang CV, Fan TWM, Phang JM. 2012. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 8983– 8988.
- LoConte NK, Brewster AM, Kaur JS, Merrill JK, Alberg AJ. 2018. Alcohol and cancer: a statement of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* **36**: 83–93.
- Luo Z et al. 2012. Cytotoxic Alkaloids from the Whole Plants of *Zephyranthes candida*. *Journal of Natural Products* **75**: 2113–2120.
- Magalhaes LG, Ferreira LLG, Andricopulo AD. 2018. Recent advances and perspectives in cancer drug design. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* **90**: 233–1250.
- McNulty J, Nair JJ, Little JRL, Brennan JD, Bastida J. 2010. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**: 5290–5294.
- Min HY, Lee HY. 2018. Oncogene-driven metabolic alterations in cancer. *Biomolecules & Therapeutics* **26**: 45.
- Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. 2012. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Modern Pathology* **25**: 1315–1325.
- Mittler F, Obeïd P, Rulina AV, Haguët V, Gidrol X, Balakirev MY. 2017. High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Models . In *Frontiers in Oncology* **7**: 293).
- Mogos VT, Dondoï CI, Bajko DE. 2018. Carcinogenic Substances Naturally Occuring in the Human Diet. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases* **25**: 105-108.
- Murata M. 2018. Inflammation and cancer. *Environmental Health and Preventive Medicine*, **23**: 50.
- Nagarajan A, Malvi P, Wajapeyee N. 2016. Oncogene-Directed Alterations in Cancer Cell Metabolism. *Trends in Cancer* **2**: 365–377.
- Nagpal M, Singh S, Singh P, Chauhan P, Zaidi MA. 2016. Tumor markers: A diagnostic tool. *National Journal of Maxillofacial Surgery* **7**: 17–20.
- Nair JJ, van Staden J. 2018. Cell cycle modulatory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *Life Sciences* **213**: 94–101.
- Nair JJ, Van Staden J. 2021. Cytotoxic tazettine alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *South African Journal of Botany* **136**: 147–156.

- Nomiri S, Hoshyar R, Ambrosino C, Tyler CR, Mansouri B. 2019. A mini review of bisphenol A (BPA) effects on cancer-related cellular signaling pathways. *Environmental Science and Pollution Research* **26**: 8459–8467.
- Ocana A, Pandiella A, Siu LL, Tannock IF. 2011. Preclinical development of molecular- targeted agents for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* **8**: 200–209.
- Ogura T, Tong KI, Mio K, Maruyama Y, Kurokawa H, Sato C, Yamamoto M. 2010. Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 2842 – 2847.
- Olsson L, Hammarström ML, Israelsson A, Lindmark G, Hammarström S. 2020. Allocating colorectal cancer patients to different risk categories by using a five-biomarker mRNA combination in lymph node analysis. *PloS One* (e0229007) DOI: 10.1371/journal.pone.0229007.
- Omoruyi SI, Kangwa TS, Ibrakaw AS, Cupido CN, Marnewick JL, Ekpo OE, Hussein AA. 2021. Cytotoxic activities of selected plants of the family Amaryllidaceae on brain tumour cell lines. *South African Journal of Botany* **136**: 118–125.
- Ortiz JE, Berkov S, Pigni NB, Theoduloz C, Roitman G, Tapia A, Bastida J, Feresin GE. 2012. Wild Argentinian Amaryllidaceae, a new renewable source of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine and other alkaloids. *Molecules* (Basel, Switzerland) **17**: 13473– 13482.
- Ou KL, Hosseinkhani H. 2014. Development of 3D in Vitro Technology for Medical Applications. In *International Journal of Molecular Sciences* DOI: 10.3390/ijms151017938.
- Ovsianikov A, Khademhosseini A, Mironov V. 2018. The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies. *Trends in Biotechnology* **36**: 348–357.
- Papaccio F, Paino F, Regad T, Papaccio G, Desiderio V, Tirino V. 2017. Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. *Stem Cells Translational Medicine* **6**: 2115-2125.
- Pavlova NN, Thompson CB. 2016. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism* **23**: 27–47.
- Pellegrino S et al. 2018. The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure* **26**: 416-425.e4.
- Pirsaheb M, Mohammadi S, Salimi A. 2019. Current advances of carbon dots based biosensors for tumor marker detection, cancer cells analysis and bioimaging. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **115**: 83–99.
- Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS. 2018. The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Frontiers in Oncology* **8**: 431.
- Pressman P, Clemens R, Hayes W, Reddy C. 2017. Food additive safety: A review of toxicologic and regulatory issues. *Toxicology Research and Application* **1**: 1-22.
- Puhr M et al. 2018. The Glucocorticoid Receptor Is a Key Player for Prostate Cancer Cell Survival and a Target for Improved Antiandrogen Therapy. *Clinical Cancer Research* **24**: 927 – 938.
- Raileanu M, Popescu A, Bacalum M. 2020. Antimicrobial Peptides as New Combination Agents in Cancer Therapeutics: A Promising Protocol against HT-29 Tumoral Spheroids. In *International Journal of Molecular Sciences* DOI: 10.3390/ijms21186964.
- Rashid S. 2017. Classification of Cancer. In *Cancer and Chemoprevention: An Overview*, Springer.

- Rasinger JD, Frenzel F, Braeuning A, Lampen A. 2018. Identification and evaluation of potentially mutagenic and carcinogenic food contaminants. *EFSA Journal* (e16085) DOI: 10.2903/j.efsa.2018.e16085.
- Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 2015. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology* **230**: 16–26.
- Rehman A, Abbas N, Saba T, Rahman SI, Mehmood Z, Kolivand H. 2018. Classification of acute lymphoblastic leukemia using deep learning. *Microscopy Research and Technique* **81**: 1310–1317.
- Reis A, Magne K, Massot S, Tallini LR, Scopel M, Bastida J, Ratet P, Zuanazzi JAS. 2019. Amaryllidaceae alkaloids: identification and partial characterization of montanine production in *Rhodophiala bifida* plant. *Scientific Reports* **9**: 8471.
- Rodrigues T, Kundu B, Silva-Correia J, Kundu SC, Oliveira JM, Reis RL, Correlo VM. 2018. Emerging tumor spheroids technologies for 3D in vitro cancer modeling. *Pharmacology & Therapeutics* **184**: 201–211.
- Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. 2018. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell* **34**: 21–43.
- Romero-López M et al. 2017. Recapitulating the human tumor microenvironment: Colon tumor-derived extracellular matrix promotes angiogenesis and tumor cell growth. *Biomaterial* **116**: 118–129.
- Roy M, Liang L, Xiao X, Feng P, Ye M, Liu J. 2018. Lycorine: A prospective natural lead for anticancer drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **107**: 615–624.
- Rychecký O, Majerská M, Král V, Štěpánek F, Čejková J. 2017. Spheroid cultivation of HT-29 carcinoma cell line in liquid marbles. *Chemical Papers* **71**: 1055–1063.
- Samah A, Fauzi M, Mansor S. 2017. Classification of benign and malignant tumors in histopathology images. 2017 IEEE International Conference on Signal and Image Processing Applications (ICSIPA) 2017: 102-106.
- Samy KE, Levy ES, Phong K, Demaree B, Abate AR, Desai TA. 2019. Human intestinal spheroids cultured using Sacrificial Micromolding as a model system for studying drug transport. *Scientific Reports* **9**: 9936.
- Sant S, Johnston P. 2017. The production of 3D tumors spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies* **23**: 27-36.
- Serkova NJ, Eckhardt SG. 2016. Metabolic Imaging to Assess Treatment Response to Cytotoxic and Cytostatic Agents. *Frontiers in Oncology* **6**: 152.
- Shafer P. 2019. Impact of US Smoke-free Air Laws on Restaurant and Bar Employment, 1990–2015. *Nicotine & Tobacco Research* **21**: 547–550.
- Shao C, Chi J, Zhang H, Fan Q, Zhao Y, Ye F. 2020. Development of Cell Spheroids by Advanced Technologies. *Advanced Materials Technologies* **5**: 1-16.
- Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, Cercek A, Smith RA, Jemal A. 2020a. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **70**: 145–164.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2020b. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **70**: 7–30.
- Silva AFS, de Andrade JP, Machado KRB, Rocha AB, Apel MA, Sobral MEG, Henriques AT, Zuanazzi JAS. 2008. Screening for cytotoxic activity of extracts and isolated alkaloids from bulbs of *Hippeastrum vittatum*. *Phytomedicine* **15**: 882–885.
- Smith MT. 2019. Key characteristics of carcinogens. *Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis*. IARC Scientific Publication **165**: 85–91.
- Spicer CD. 2020. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice. *Polymer Chemistry* **11**: 84–219.

- Strasser A, Vaux DL. 2020. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Molecular Cell* **78**: 1045–1054.
- Strilic B, Offermanns S. 2017. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell* **32**: 282–293.
- Suresh S. 2007. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomaterialia* **3**: 413–438.
- Thakuri PS, Gupta M, Joshi R, Singh S, Tavana H. 2019a. Synergistic Inhibition of Kinase Pathways Overcomes Resistance of Colorectal Cancer Spheroids to Cyclic Targeted Therapies. *ACS Pharmacology & Translational Science* **2**: 275–284.
- Thakuri PS, Gupta M, Plaster M, Tavana H. 2019b. Quantitative Size-Based Analysis of Tumor Spheroids and Responses to Therapeutics. *ASSAY and Drug Development Technologies* **17**: 140–149l.
- Thakuri PS, Luker GD, Tavana H. 2019c. Cyclical treatment of colorectal tumor spheroids induces resistance to MEK inhibitors. *Translational Oncology* **12**: 404–416.
- Truitt ML, Ruggero D. 2016. New frontiers in translational control of the cancer genome. *Nature Reviews Cancer* **16**: 288–304.
- Türkan F, Taslimi P, Abdalrazaq SM, Aras A, Erden Y, Celebioglu HU, Tuzun B, Ağırtaş MS, Gülçin İ. 2020. Determination of anticancer properties and inhibitory effects of some metabolic enzymes including acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, alpha-glycosidase of some compounds with molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* DOI: 10.1080/07391102.2020.1768901.
- Upadhyay SD, Ahmad Y, Kohli S. 2020. A review on pharmacological potential of galantamine. *Pharmacognosy Communications* **10**: 63–66.
- Vadivelu RK, Kamble H, Munaz A, Nguyen NT. 2017. Liquid marbles as bioreactors for the study of three-dimensional cell interactions. *Biomedical Microdevices* **19**: 1–9.
- Wei Q, Qian Y, Yu J. 2020. Metabolic rewiring in the promotion of cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *Oncogene* **39**: 6139–6156.
- Wright AKWTC, Ronnett AFBM, Kurman RJ. 2016. 6 Carcinoma and Other Tumors of the Cervix. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, Springer Boston.
- Xiong GF, Xu R. 2016. Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression. *J Cancer Metastasis Treat* **2**: 357.
- Zaman A, Wu W, Bivona TG. 2019. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future. In *Cancers* **11**: 1197.
- Zenata O, Dvorak Z, Vrzal R. 2017. Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines. *Toxicology Letters* **281**: 10–19.
- Zhang D, Li W, Ma Z, Han H. 2019. Improved ELISA for tumor marker detection using electro-readout-mode based on label triggered degradation of methylene blue. *Biosensors and Bioelectronics* **126**: 800–805.
- Zhang H, Chen J. 2018. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer* **9**: 1773–1781.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ATCC – American Type Culture Collection
BChE – Butyrylcholinesteráza
BPA – Bisfenol A
CAF – Fibroblasty spojené s nádorovým onemocněním
CO₂ – oxid uhličitý
DMEM – Dulbecco Modified Egles Medium
DMSO – Dymethylsulfoxid
DNA – Deoxyribonukleová kyselina
Doxo – Doxorubicin
ECM – Extracelulární matrice
FBS – fetální bovinní sérum
FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GA – Gramicidin
HAD – Heamanthidin
HAE – Heamanthimin
HIV – RNA virus
IARC – Národní agentura pro výzkum a onemocnění
KK – kolorektální karcinom
KLK6 – Kallikrein 6
MetOH – Methanol
Mr – Relativní molekulová hmotnost
MTT – (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid)
MUC2 – Mucin 2
MYC – regulačních genů a protoonkogenů, které kódují transkripční faktory
NCI – Národní institut pro nádorové onemocnění
NIAA – Americký národní institut pro zneužívání alkoholu a alkoholismu
NIH – Národní institut zdraví
NIST – Národní institut standartu a technologie
NMR – Spektroskopická nukleární magnetická rezonance
NRF2 – Nukleární transkripční faktor
OVCARR3 – Ovariální karcinom
PAU – Polycyklické aromatické uhlovodíky
PBS - Phosphate Buffer Saline, fosfátový pufr
POSTN – Periostin.
PTC – Peptidyltransferáza
PVC – Polyvinylchlorid
qRT-PCR – Kvantitativní reverzní analýza transkriptázy-polymerázové řetězové reakce
RNA – Ribonukleová kyselina
RNS – Reaktivní forma dusíku
ROS – Reaktivní forma kyslíku
RP – Relativní riziko
SD – Směrodatná odchylka

SLC53D3 – Rodina nosičů solute – Solute carrierfamily (SLC) gen 53D3

TGCA – Program Atlas rakoviny genomu

TME – Mikroprostředí nádoru

USA – Spojené státy americké

