

Praca poglądowa/Review paper

Porównanie efektywności nanocząstek złota
w hodowli komórkowej 2D oraz 3D*The comparison of gold nanoparticles effectiveness
in 2D and 3D cell culture*Barbara Szymkowiak¹, Marika Musielak^{2,3,4}, Agnieszka Boś-Liedke⁵¹Wydział Fizyki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań²Katedra i Zakład Elektromedycyny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań³Szkoła Doktorska, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań⁴Pracownia Radiobiologii, Wielkopolskie Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Poznaniu, Poznań⁵Zakład Fizyki Makromolekularnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań**Streszczenie**

Tworzenie hodowli komórkowych w celach naukowych umożliwiła uzyskanie nowej wiedzy, a w konsekwencji dokonania odkryć w zakresie biologii komórki czy biofizyki. Badania *in vitro* pozwalają na obserwację linii komórkowych, a także interakcji z wprowadzonymi substancjami lub materiałami. Mają one nieoceniony wkład w rozwój nanomedycyny, która współcześnie cieszy się dużym zainteresowaniem. Szczególnie popularne i obiecujące, zwłaszcza pod względem walki z nowotworami, są nanocząstki złota (ang. gold nanoparticles, GNPs). Dzieje się tak, ze względu na specyficzne (m.in. elektryczne, magnetyczne, optyczne, mechaniczne) właściwości nanocząstek, znacznie różniących się od złota w skali makro. Niestety, wyniki badań *in vitro* bywają czasem niezgodne z przeprowadzonymi badaniami *in vivo*. Nanocząstki, które sprawdzają się na płaszczyźnie komórkowej nie zawsze tak samo efektywnie działają na modelach zwierzęcych. Przyczyną tego faktu jest wielorakość złożonych procesów metabolicznych, zachodzących w organizmie podczas badań *in vivo*. Większość badań komórkowych wykonuje się na strukturach dwuwymiarowych, które odzwierciedlają rzeczywiste warunki w sposób przybliżony. Aktualnie, żadna z technik *in vitro* nie jest w stanie odzwierciedlić identycznych fizjologicznych warunków panujących w modelach zwierzęcych. Jednakże, współczesna nauka potrafi odwzorowywać je w sposób precyzyjniejszy używając hodowli trójwymiarowej (ang. 3-dimensional, 3D), która jest o wiele bardziej złożona. Projektując nowe badania należy wziąć pod uwagę wady i zalety każdej z wymienionych metod hodowli komórkowej. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie różnic między hodowlą komórkową dwuwymiarową, a trójwymiarową z uwzględnieniem zastosowania nanocząstek złota.

Adres do korespondencji

Marika Musielak

Pracownia Radiobiologii,

Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań, Polska

e-mail: marikamusielak@gmail.com

Abstract

The creation of cell cultures for scientific purposes has made it possible to obtain new knowledge and consequently to make discoveries in the field of cell biology or biophysics. *In vitro* studies allow for the observation of cell lines as well as interactions with introduced substances or materials. They have an invaluable contribution to the development of nanomedicine, which is attracting a lot of interest. Gold nanoparticles (GNPs) are particularly popular and promising, especially in terms of cancer therapy. This is due to the specific (e.g. electrical, magnetic, optical, mechanical) properties of nanoparticles, significantly different from gold particles of macro size. Unfortunately, the results of *in vitro* studies are sometimes inconsistent with *in vivo* studies. Nanoparticles that work well at the cellular level are not always as effective in animal models. The reason for this is the multiplicity of complex metabolic processes occurring in the body during *in vivo* studies. Most cell studies are performed on two-dimensional structures that approximate real-world conditions. Currently, none of the *in vitro* techniques is able to reflect the identical physiological conditions prevailing in animal models. However, modern science can map them more precisely using 3D culture, which is much more complex and less efficient. When designing new studies, the advantages and disadvantages of each of the mentioned cell culture methods should be considered. The purpose of this publication is to present the differences between two-dimensional and three-dimensional (3D) cell cultures, taking into account the use of gold nanoparticles.

Słowa kluczowe: hodowle komórkowe 2D, hodowle komórkowe 3D, nanocząstki złota, nanotechnologia, onkologia

Key words: 2D cell culture, 3D cell culture, gold nanoparticles, nanotechnology, oncology

Wstęp

Nanomedycyna zajmuje się zastosowaniem nanotechnologii w celu projektowania nowoczesnych metod leczenia (1). „Nano-” to przedrostek jednostki miary oznaczający jedną miliardową (10^{-9}). Skala nanomedycyny jest zawarta w przedziale od 1 do 100 nanometrów. Nanostruktury mające średnicę nie większą niż 12 nm są zdolne do przekraczania bariery krew-mózg, a nanostruktury o długości nie większej niż 30 nm mogą być absorbowane przez komórki (2). Nanomateriały wykazują potencjalne zastosowanie w różnego rodzaju terapiach i obrazowaniu (3). Właściwości danych nanostruktur determinują ich potencjalne zastosowanie. Metaliczne nanocząstki (ang. nanoparticles, NPs) podwyższają efektywność konwencjonalnych metod diagnostycznych umożliwiając wykrycie niewielkich przerzutów np. przy raku prostaty (4). Wykorzystanie NPs o właściwościach magnetycznych w technice obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI) obniża czas relaksacji przez zaburzenie jednorodności pola magnetycznego (5). Co więcej, nanocząstki srebra i nanocząstki złota cechują się występowaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego (ang. surface plasmon resonance, SPR) (6) given in conjunction with radiation therapy (RT). Ocena tego parametru pozwala na określenie kształtu i wielkości nanostruktur oraz potencjalnego sposobu agregacji w komórkach (7). Wykazano, że podczas leczenia raka jelita grubego cisplatyną w połączeniu z GNPs, zastosowanie GNPs zwiększa perfuzję naczyń oraz dostarczenie cisplatyny (8).

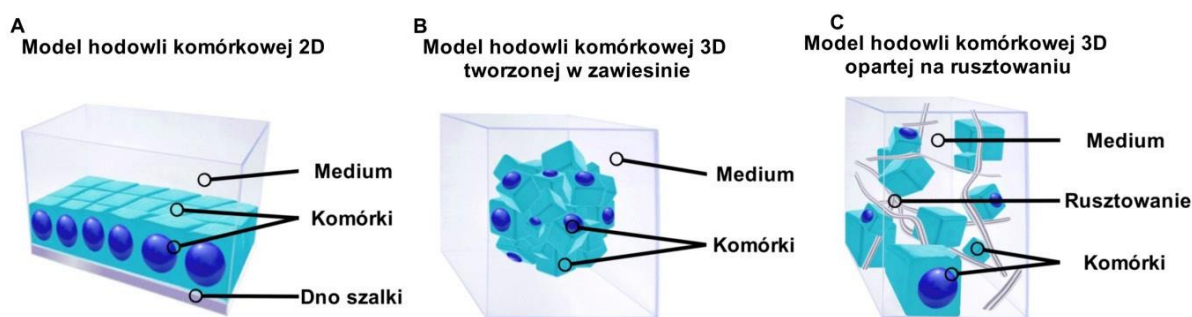
Rozwój w badaniach nad NPs jest bardzo dynamiczny, jednak niewiele rodzajów nanostruktur zostało wprowadzonych do praktyki klinicznej (9). Jednym z powodów jest użycie mało dokładnych modeli komórkowych podczas podstawowych prac badawczych. Wciąż najczęściej wykorzystywanymi są dwuwymiarowe (ang. two-dimensional, 2D) hodowle komórkowe (10). Innym rodzajem modeli komórkowych *in vitro* są hodowle trójwymiarowe, które pod względem fizjologicznym stanowią przejście między hodowlami 2D, a warunkami *in vivo*. Pomimo pozytywnie zakończonych testów *in vitro* zdarza się, że naukowcy uzyskują rozczarowujące wyniki swoich badań w środowisku *in vivo* (11).

Celem pracy jest przedstawienie aktualnej wiedzy na temat stosowania GNPs podczas eksperymentów w różnych rodzajach hodowli komórkowej: 2D i 3D. Wykorzystanie danych modeli komórkowych ma znaczący wpływ na uzyskiwane wyniki, a w konsekwencji na możliwe implementowanie nanostruktur w terapii. Przedstawione zostanie porównanie pomiędzy modelem 2D i 3D w badaniu GNPs, jak również ograniczenia i korzyści wynikające z wykorzystania danego rodzaju hodowli.

Charakterystyka hodowli 2D oraz 3D

Eksperymenty z wykorzystaniem hodowli komórkowych umożliwiają opisanie mechanizmów chemicznych i biologicznych oraz obserwacje odpowiedzi na potencjalne leczenie (12). Są również wykorzystywane do określania cytotoksyczności danych związków. Wyróżnia się hodowle komórkowe 2D oraz 3D, które z kolei dzielą się na: sferoidy, organoidy (13) electronics, agriculture, chemical catalysis, food industry, and many others. More recently, nanoparticles are also being synthesized 'biologically' through the use of plant- or microorganism-mediated processes, as an environmentally friendly alternative to the expensive, energy-intensive, and potentially toxic physical and chemical synthesis methods. This transdisciplinary approach to nanoparticle synthesis requires that biologists and biotechnologists understand and learn to use the complex methodology needed to properly characterize these processes. This review targets a bio-oriented audience and summarizes the physico-chemical properties of nanoparticles, and methods used for their characterization. It highlights why nanomaterials are different compared to micro- or bulk materials. We try to provide a comprehensive overview of the different classes of nanoparticles and their novel or enhanced physicochemical properties including mechanical, thermal, magnetic, electronic, optical, and catalytic properties. A comprehensive list of the common methods and techniques used for the characterization and analysis of these properties is presented together with a large list of examples for biogenic nanoparticles that have been previously synthesized and characterized, including their application in the fields of medicine, electronics, agriculture, and food production. We hope that this makes the many different methods more accessible to the readers, and to help with identifying the proper methodology for any given nanoscience problem.”, ”container-title”:”Journal of Nanobiotechnology”, ”DOI”:”10.1186/s12951-022-01477-8”, ”ISSN”:”1477-3155”, ”issue”:”1”, ”journalAbbreviation”:”J Nanobiotechnol”, ”language”:”en”, ”page”:”262”, ”source”:”DOI.org (Crossref i organs-on-chips (14). Hodowle 3D umożliwiają formowanie na tyle złożonych struktur, iż mogą służyć jako niedoskonałe odpowiedniki organów, zwane organoidami (15).

Hodowla 2D polega na osadzeniu monowarstwy komórkowej w szalce Petriego lub w butelce do hodowli komórkowej. Pojedyncza warstwa komórek wzrasta przywarta do dna naczynia. W przeciwieństwie do modeli 2D, wszystkie kultury komórkowe 3D rosną wielowarstwowo. Ze względu na środowisko w którym powstają (16), wyróżnia się hodowle oparte na: rusztowaniu, w której komórki osadzone są w matrycy naśladującej macierz zewnątrzkomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM) (17) oraz bez rusztowania (18) including hydrogel scaffold-based models, which possess a complex structure mimicking the extracellular matrix. These hydrogels can be made of polymers (natural or synthetic (m.in. tworzone w zawiesinie (19))), płytkach o ultra niskiej adhezji (20) oraz powstające przez wykorzystanie lewitacji magnetycznej (21). Modele różnią się wzajemnym położeniem komórek (Ryc. 1).



Ryc.1. Rodzaje hodowli komórkowych. Schematy przedstawiają; A: model hodowli komórkowej 2D, B: model hodowli komórkowej 3D przeprowadzonej w zawiesinie, C: model hodowli komórkowej 3D opartej na rusztowaniu.

Biorąc pod uwagę doniesienia naukowe (22), autorzy mogą spodziewać się znaczących rozbieżności w potencjalnych wynikach stosowania różnych modeli komórkowych (Tabela 1.). W tkankach, w warunkach *in vivo* występują gradienty stężeń tlenu oraz pH, a także składników rozpuszczalnych (składniki odżywcze, cząsteczki efektorowe, metabolity komórkowe) (17). Wpływa to na aktywność danej komórki m.in. na jej

ruchliwość, migracje, chemotaksję i morfogenezę. Co więcej, modele *in vitro* różnią się dostępnością tlenu do komórek, co przy modelach guzów nowotworowych ma kluczowe znaczenie. W modelu 2D wszystkie komórki mają równy dostęp do pożywki. Wykonując tego typu badania należy uwzględnić brak gradientów stężeń występujących w warunkach fizjologicznych (17). Natomiast sferoidy oraz organoidy o pewnych rozmiarach są zdolne do odtwarzania dotlenienia i odżywienia w sposób zbliżony do warunków *in vivo* (20). Jeżeli hodowla 3D tworzy własne ECM, umożliwia to obserwację interakcji komórka-macierz (17). Hodowle 3D są również zróżnicowane wewnętrznie (23). Struktura sferoid może składać się z różnych warstw komórkowych jak obwód proliferacyjny, strefa o minimalnej aktywności metabolicznej czy strefa nekrotyczna (24). Z tego względu nadają się do precyzyjniejszego niż w przypadku hodowli 2D, określenia inwazyjności danego nowotworu, zdolności do przerzutów oraz interakcji komórka-komórka/macierz (25).

Tabela 1. Różnice hodowli komórkowych 2D oraz 3D.

Cecha hodowli komórkowej	Hodowla komórkowa	
	2D	3D
Powierzchnia styku komórek	Komórka ma większą powierzchnię styku z naczyniem hodowlanym oraz pożywką niż z innymi komórkami (26)	Występuje komunikacja między komórkami (jony, małe cząsteczki, prąd elektryczny) (27)
Występowanie powierzchni styku	komórka-komórka komórka-medium (28)	a) Hodowla 3D z zastosowaniem rusztowania: komórka-komórka komórka-rusztowanie komórka-medium b) Hodowla 3D przeprowadzana w zawieszynie: komórka-komórka komórka-medium (28)
Proliferacja	Namnażanie następuje znacznie szybciej niż w warunkach <i>in vivo</i> (29)	Szybkość rozrostu zależna od rodzaju komórek oraz hodowli (30). Tempo odpowiadające <i>in vivo</i> , (31)\n \n Two-dimensional (2D
Koszty utrzymania	Tańsze niż hodowla 3D (32).	Droższe od hodowli 2D (24). Tańsze od badań <i>in vivo</i> (27).
Literatura na temat danego rodzaju hodowli	Istnieje wiele publikacji. Łatwa interpretacja danych (33)	Dotychczasowo powstało mniej prac niż w przypadku hodowli 2D (34). Utrudniona interpretacja danych (22).
Podobieństwo do warunków <i>in vivo</i>	Niewysokie (12)	wysokie including hydrogel scaffold-based models, which possess a complex structure mimicking the extracellular matrix. These hydrogels can be made of polymers (natural or synthetic
Dostęp do pożywki i tlenu	Łatwy, jednakowy dla wszystkich komórek (35)	Model uwzględnia gradienty stężeń zbliżone do występujących w środowisku <i>in vivo</i> (35)
Odtwarzalność danej hodowli	Wysoka, dobra dla kultur długoterminowych (34)	Często trudna do osiągnięcia (22)

Dostępność do testów funkcjonalnych	testy są powszechnie dostępne (36)	Brak standardowych testów (36)
Rozmieszczenie komórek w przestrzeni	Komórki hodowane jednowarstwowo. Komórki rosną tylko w dwóch wymiarach (37)	Komórki tworzą wielowarstwowe kultury. Rosną w trzech wymiarach (38)
Środowisko	Komórki są umieszczone na płaszczyźnie (39)	Komórki w matrycy (40)
Kształt komórek	Splaszczone, wydłużone (41)	Kształt zbliżony do komórek w warunkach in vivo (27)
Zróżnicowanie komórek	Występuje słabe zróżnicowanie (42) Często hodowle są monokulturami. (28)	Występuje heterogeniczność. Sferoidy składają się z trzech stref: obwód proliferacyjny, strefa o minimalnej aktywności metabolicznej, strefa nekrotyczna (43).
Wrażliwość na leki	Zazwyczaj wykazują większą wrażliwość na leki, niż występowałyby w środowisku in vivo (44).	Metabolizm bardziej zbliżony do in vivo, co skutkuje wyższą opornością na leki (45).
Ekspresja genów oraz białek	Często znacznie odbiega od in vivo (46). Zmieniona ekspresja i splicing genów (36)	Zbliżona do in vivo (47)
Odpowiedź na bodźce	Niedokładna (34)	Odpowiedź wysoce zbliżona do in vivo (48)
Polaryzacja	Zmiana polaryzacji (28)	Dokładniejszy obraz polaryzacji (22)
Wychwyty nanocząstek	Wysoki (49)	Znacznie niższy niż w hodowli 2D (49)
Sposób wychwyty nanocząstek złota	Równomierne odkładanie GNPs we wszystkich komórkach (50)	Nierównomierne odkładanie GNPs przez uwzględnienie gradientów stężeń w modelu (50)

Nanocząstki złota

GNPs charakteryzują się stabilnością chemiczną i biokompatybilnością, występowaniem SPR (51), łatwością w zmianie ich kształtu, wysoką absorpcją promieniowania rentgenowskiego (52) oraz prostotą syntezy (53). GNPs połączone z ligandami tworzą kompleks użyteczny we współczesnej diagnostyce m.in. w tomografii komputerowej oraz badaniu MRI (54). Sprawdzają się także w terapii fototermicznej (szczególnie nanopaleczki złota, (*ang. gold nanorods*, GNR) oraz nanoskorup złota) (55), przekształcając promieniowanie elektromagnetyczne w energię cieplną. GNRs posiadają wysoką absorpcję w bliskiej podczerwieni i w zakresie widzialnym. Paleczki mogą posłużyć jako nośniki leków (56) oraz biomakromolekuł (np. insuliny) (57), środki kontrastowe (58) oraz radiosensybilizatory (59). Połączone z poli(tlenkiem etylenu) (*ang. polyethylene glycol*, PEG) pozostają we krwi niewykryte przez makrofagi, dzięki czemu ich czas cyrkulacji w krwioobiegu jest dłuższy (60). Istnieją doniesienia, iż GNPs sprawdzają się również jako podłoże do hodowli komórkowej (61).

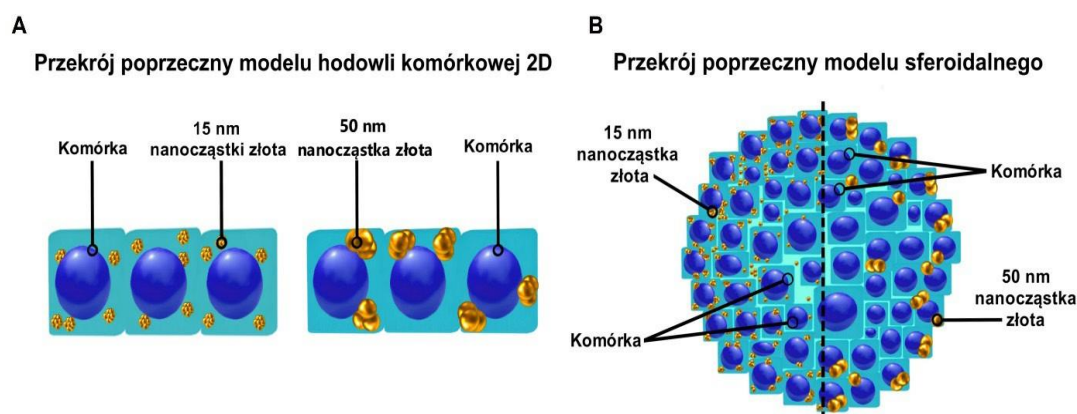
Nanocząstki złota to obiecujące narzędzie w leczeniu nowotworów, a także innych typów chorób. Ich zastosowanie może mieć znaczący wpływ na zminimalizowanie skutków ubocznych radioterapii (62), dzięki czemu uszkodzenia w obszarze zdrowych komórek zostaną znacząco ograniczone. Szczególnie obiecującą formą złota do stosowania w radioterapii są nanosfery (50). Wykazano, że zastosowanie GNPs funkcjonalizowanych PEG oraz peptydem RGD (*ang. arginylglycylaspartic acid*, Arg-Gly-Asp, RGD) uwrażliwia komórki nowotworowe piersi MCF-7 na promieniowanie jonizujące. Podejrzewa się, że długość

łańcucha PEG wpływa na efektywność tego procesu. W analizie porównano wrażliwość komórek w modelu 2D oraz 3D stosując przed napromienianiem cztery rodzaje funkcjonalizowanych sferycznych GNPs - różniących się rozmiarem (10 i 30 nm) oraz długością łańcucha PEG (masa cząsteczkowa 2000 i 800 Da). Po napromienieniu hodowli 2D dawką 2 Gy uzyskano mniejszą frakcję przeżywalności w przypadku traktowania komórek nanocząstkami z dołączonym łańcuchem PEG o masie cząsteczkowej 2000 Da w porównaniu do GNPs z łańcuchem PEG 800 Da. W eksperymentach przeprowadzonych na hodowli 3D nie wykazano statystycznie istotnych różnic względem napromienionych hodowli (63).

Cykl komórkowy to seria procesów zachodzących w komórce eukariotycznej prowadząca do jej podziału. Składa się kolejno z faz G1, S, oraz G2/M (64). W przypadku niewystarczającej ilości składników odżywczych komórka może wejść w fazę spoczynku G0. Część komórek guzów nowotworowych oddalonych od naczyń krwionośnych wchodzi w fazę G0 lub G1 stając się niewrażliwymi na chemioterapię oraz radioterapię. Może to skutkować bardziej rezystywną odpowiedzią na wybrane leczenie (65). Docetaksel stosowany w chemioterapii zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G2/M (66). Wykazano, że ten cytostatyk połączony z GNPs w linii komórkowej MCF7 jest 2,5 razy bardziej skuteczny niż bez GNPs (67). Ze względu na wyższą wrażliwość komórek w fazie G2/M, niż w innych fazach, na promieniowanie jonizujące (68) związek docetaksel-GNPs sprawdza się jako radiosensybilizator (50).

Wychwyty nanocząstek złota

Wychwyty (inaczej absorpcja lub internalizacja) nanostruktur w modelu 3D, w porównaniu z 2D, jest bardziej zbliżony do rzeczywistego. Sferoidy oraz organoidy zawierają gradienty stężeń tlenu i składników odżywczych panujących w warunkach zwierzęcych (69). Modele oparte na rusztowaniu mniej wiernie przedstawiają warunki *in vivo*, niż hodowle w zawiesinie (70). NPs napotykają gęstą sieć rusztowania, której właściwości wpływają również na funkcjonowanie samej hodowli (17). Można także zauważyć, że GNPs wielkości 15 nm wnikają bardziej w głąb sferoidy, a większe 50 nm GNPs zatrzymują się bliżej jej zewnętrznej części (granicy sferoida-medium) (71) (Ryc. 2.). Pomimo, iż GNPs 15 nm lepiej penetrują pod względem ilościowym, okazuje się, że zawartość masowa złota wewnątrz sferoidy będzie większa w przypadku GNPs o średnicy 50 nm (72). Badania wykazały także, że komórkowe sferoidy odznaczają się wyższą internalizacją mniejszych GNPs tj. o średnicy <10 nm niż tych o 15 nm średnicy (73).



Ryc. 2. Internalizacja GNPs w dwóch rozmiarach 15 i 50 nm. A: wychwyty GNPs w hodowli komórkowej 2D, B: wychwyty GNPs w hodowli komórkowej 3D.

W innym przypadku, GNPs o średnicy 2 nm w porównaniu z 4 nm wykazują trzykrotnie większą zdolność do penetracji (74). Wychwyty GNPs jest warunkowany również kształtem danej nanostruktury. Sferyczne GNPs wnikają w sferoidy bardziej niż GNR, co wykazali Sokolova i współautorzy (20). Nanogwiazdy, GNR oraz nanotrójki złota o podobnej wielkości (~50 nm) pokryto PEG z eterem metylowym i przetestowano na linii komórkowej mysich makrofagów RAW264.7. Wychwyty komórkowy był najbardziej efektywny w przypadku

nanotrójkątów, następnie GNR, a najsłabiej zostały zaabsorbowane nanogwiazdy. Kształt danej NPs określa rodzaj mechanizmu endocytozy (75).

Analizując wychwyt NPs w modelu *in vivo*, należy zwrócić uwagę na drogę, którą pokonują zanim dotrą do komórki. Internalizacja GNPów może zajść przez endocytozę za pośrednictwem receptora. GNPów po dotarciu do błony łączą się z receptorami na powierzchni komórki. Dochodzi do inwazji błony oraz zamknięcia NPs w pęcherzykach endosomalnych. Następuje sortowanie pęcherzyków oraz połączenie ich z lizosomami. Ostatecznie zostają one wydalone z komórki (50). Niektóre NPs mogą akumulować się w innych organellach niż lizosomy. GNPów wielkości 1-2 nm są zdolne do przekraczania błon komórkowych oraz jądrowych (20). Posiadając średnicę 2 i 6 nm pokryte tioproniną mają zdolność wnikania do jąder komórek nowotworowych linii MCF-7. Wg Huo i współautorów mniejsze (2 nm) mogą łatwiej i szybciej wnikać do komórek oraz jąder (76).

Kolejnym istotnym aspektem jest ładunek powierzchniowy (77). Naładowane ujemnie GNR, o długości 55 nm i średnicy 14 nm, są zdolne do penetracji sfer utworzonych z linii MCF-7, a naładowane dodatnio jedynie kumulują się w obszarze zewnętrznym. Dobór ładunku powierzchniowego nanostruktury umożliwia kontrolowaną penetrację tkanek (78). Wychwyt GNPów jest zależny również od faz cyklu komórkowego, w której populacja komórek się znajduje (49). Najwyższą internalizację NPs wykazano, gdy populacja komórek jest zsynchronizowana w fazie G₂ / M (79), niższą w fazie S, najniższą w fazie G₀/G₁. NPs w hodowlach 2D są absorbowane na podobnym poziomie, równomiernie przez wszystkie komórki (49). Aby podwyższyć efektywność wychwytu danych NPs przyłącza się do nich jony lub elektrycznie obojętne cząsteczki zwane ligandami (11). Jednakże, nie każdy rodzaj funkcjonalizacji ma wpływ na poziom internalizacji. Odkryto, że obecność cytrynianu sodu na powierzchni nanocząstek, nie zmienia wychwytu GNPów w ludzkich liniach komórkowych typu ATII (80).

Cytotoksyczność nanocząstek złota

Stosując NPs w biomedycynie należy uwzględnić ich cytotoksyczność (81), aby uniknąć niepożądanych skutków ubocznych (2). Głównym celem leczenia nowotworów jest zniszczenie komórek nowotworowych przy jednoczesnym zminimalizowaniu uszkodzeń zdrowych tkanek (4). Cytotoksyczność nie jest determinowana jedynie materiałem, z którego składa się dana nanostruktura. Czynniki, które także wpływają na tego typu właściwość są m.in. jej kształt (51), wielkość (63), funkcjonalizacja powierzchni (53), rozkład ładunku powierzchniowego (18) including hydrogel scaffold-based models, which possess a complex structure mimicking the extracellular matrix. These hydrogels can be made of polymers (natural or synthetic oraz stężenie NPs w danym ośrodku (82). Powszechnie uważa się, że złote nanostruktury charakteryzują się niską toksycznością, natomiast istnieją również doniesienia o ich silnej zdolności do zaburzania funkcjonowania komórek (83). Dowiedziono, że GNR wpływają na fizjologię hodowli komórkowych prostaty PNT1A oraz raka prostaty LNCaP i PC-3 wykazując silną toksyczność względem tych linii (84). Wpływ NPs jest uzależniony zarówno od toksyczności NPs jak i od środowiska jej działania. Obserwowana cytotoksyczność może być różna w zależności od modelu komórkowego, czynników molekularnych danego podtypu nowotworu oraz wpływu mikrośrodowiska (50). Dominującą strukturą stosowaną w badaniach jest model 2D ze względu na niższe koszty i wyższą efektywność wykonania w porównaniu z modelami 3D (85). Dla przykładu, udowodniono, że cytotoksyczność cytrynianowych (anionowych), a także pokrytych bromkiem heksadecylotrimetyloamoniowym (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB) (kationowych) GNPów była znacznie większa w środowisku hodowli 2D ludzkich komórek raka wątroby w porównaniu z 3D (2). Co więcej, zanieczyszczenia na powierzchni GNPów są także istotne pod względem cytotoksyczności (80). W celu syntezy GNR wykorzystuje się różnego rodzaju opłaszczania lub surfaktanty jak np. CTAB. Wykazano, że inkubacja hodowli linii komórkowych LNCaP, PC-3 oraz PNT1A z GNR zwiększa ilość powstawania wolnych rodników tlenu. Wartość ta wzrasta wraz z zastosowanym stężeniem NPs co prawdopodobnie wynika z wyższych ilości uwalnianego surfaktantu (84).

Cytotoksyczność można ograniczać za pomocą dobierania odpowiednich ligandów lub modyfikacji powierzchni (2). Biorąc pod uwagę badania *in vivo*, uzyskany efekt zależy także od sposobu podania NPs. Odkryto, że najbardziej toksyczne jest podanie doustne oraz dootrzewne, a najmniejsza toksyczność została wykazana dostarczając NPs drogą dożylną (86). Nanocząstki złota o wysokim stężeniu i małym rozmiarze

wykazują zwiększoną cytotoksyczność ze względu na sposób akumulacji w narządach (84). W modelach mysich stosunkowo duże GNPs (42,5 i 61,2 nm) gromadzą się w śledzionie oraz wątrobie, a mniejsze (6,2 i 24,3 nm) w wielu narządach, a następnie usuwane są znacznie szybciej (82) (Tabela 2.).

Tabela 2. Charakterystyczne różnice dla GNPs o wielkości ok. 15 oraz 50 nm.

Proces	Mniejsze GNPs (ok. 15 nm)	Większe GNPs (ok. 50 nm)	Referencja
Wychwyt	skuteczniejsza penetracja	W modelach sferoidalnych zatrzymują się bliżej zewnętrznej części.	(72)
Miejsce kumulacji	gromadzą się w wątrobie i śledzionie	kumulują się w wielu narządach	(82)
Wydalenie	mniej niż 30 dni	występowanie szczątkowych fragmentów po 90 dniach	(82)

Perspektywy

Według doniesień American Cancer Society przewiduje się, że w 2023 roku w samych Stanach Zjednoczonych u blisko 2 milionów osób zostanie zdiagnozowany nowotwór, a około 609 820 chorych umrze z powodu tej choroby. To szacunkowo 1 671 zgonów dziennie licząc jedynie Amerykę Północną i Amerykę Południową (87). Wiedza uzyskana na podstawie badań przeprowadzonych z zastosowaniem modeli 3D może przyczynić się do uzupełnienia wiedzy w zakresie stosowania GNPs, umożliwiając projektowanie potencjalnych badań przedklinicznych. W przyszłości mogą one poskutkować nowymi terapiami lub wspomaganie konwencjonalnych metod leczenia. Różne podtypy molekularne nowotworów wykazują wiele wspólnych cech, natomiast ich charakterystyka jest różna dla każdego chorego (50). Ze względu na heterogeniczność komórek przy hodowli organoidalnej możliwe jest przybliżone odtworzenie złożoności danego guza nowotworowego. Próbkę komórek nowotworowych można pobrać przez biopsję guza pierwotnego (24), a następnie w celu prowadzenia badań *in vitro* utworzyć hodowlę komórkową 3D. W ten sposób leczenie onkologiczne stanie się bardziej precyzyjne oraz często zdecydowanie mniej inwazyjne. Pozwoli to na jakościową i ilościową obserwację proponowanej terapii z użyciem GNPs wraz z jej skutkami, umożliwiając powstanie terapii personalizowanej. Zmniejszy to także prawdopodobieństwo ryzyka rozwoju wtórnych nowotworów. Korzystając z modeli organoidalnych można odtworzyć w warunkach *in vitro* jednocześnie kilka guzów, których materiał został pobrany od chorego i sprawdzić ich odpowiedź na traktowanie GNPs. Ze względu na pochodzenie danej linii komórkowej oraz formy hodowli zgodność wyników modeli *in vitro* z *in vivo* byłoby efektywnym rozwiązaniem dla wielu chorych. Tym sposobem możliwym będzie testowanie wielu innowacyjnych metod z bieżącym ustalaniem cytotoksyczności GNPs z uwzględnieniem ich korelacji ze zmianami genetycznymi. Przyszły sukces kliniczny nanocząstek złota zależy w szczególności od rozwoju i optymalizacji wydajności modeli 3D opartych na liniach pierwotnych wyizolowanych od chorych.

Wnioski

Wyniki badań prowadzonych *in vitro* mogą różnić się w zależności od użytego modelu komórkowego. Określenie cytotoksyczności oraz internalizacji NPs na podstawie samego modelu 2D okazuje się nieprecyzyjne w przypadku nanostruktur złota porównując do danych uzyskanych w modelach zwierzęcych. Ponadto, eksperymenty są zwykle przeprowadzane w ograniczonych warunkach, które nie pozwalają na dokładną ocenę zaistniałych efektów. Skuteczność działania GNPs zależy od indywidualnej wrażliwości różnych typów komórek nowotworowych, którą można opisać wieloma procesami i czynnikami na wyższym poziomie molekularnym. Znalezienie takiej korelacji może pozwolić na określenie możliwych podgrup chorych o różnych odpowiedziach biologicznych na nową potencjalną terapię. Przyszły sukces kliniczny GNPs jest zależny od bardziej szczegółowego zrozumienia dynamiki interakcji i mechanizmów, dzięki którym ich właściwości fizykochemiczne wpływają na indywidualną odpowiedź biologiczną (33).

Bibliografia

- [1] Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres M del P, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol.* 2018 Dec;16(1):71.
- [2] Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res.* 2010 Sep;12(7):2313–33.
- [3] Bouché M, Hsu JC, Dong YC, Kim J, Taing K, Cormode DP. Recent Advances in Molecular Imaging with Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.* 2020 Feb 19;31(2):303–14.
- [4] Retif P, Pinel S, Toussaint M, Frochot C, Chouikrat R, Bastogne T, et al. Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics.* 2015;5(9):1030–44.
- [5] Musielak M, Piotrowski I, Suchorska WM. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as a multifunctional tool in various cancer therapies. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy.* 2019 Jul;24(4):307–14.
- [6] Bromma K, Dos Santos N, Barta I, Alexander A, Beckham W, Krishnan S, et al. Enhancing nanoparticle accumulation in two dimensional, three dimensional, and xenograft mouse cancer cell models in the presence of docetaxel. *Sci Rep.* 2022 Aug 5;12(1):13508.
- [7] Amendola V, Pilot R, Frascioni M, Maragò OM, Iatì MA. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J Phys: Condens Matter.* 2017 May 24;29(20):203002.
- [8] Zhao X, Pan J, Li W, Yang W, Qin L, Pan Y. Gold nanoparticles enhance cisplatin delivery and potentiate chemotherapy by decompressing colorectal cancer vessels. *IJN.* 2018 Oct;Volume 13:6207–21.
- [9] Caracciolo G, Farokhzad OC, Mahmoudi M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo : Clinical Implications of the Protein Corona. *Trends in Biotechnology.* 2017 Mar;35(3):257–64.
- [10] Chaicharoenaudomrung N, Kunhorm P, Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an *in vitro* platform for cancer and stem cell modeling. *WJSC.* 2019 Dec 26;11(12):1065–83.
- [11] Van Zundert I, Fortuni B, Rocha S. From 2D to 3D Cancer Cell Models—The Enigmas of Drug Delivery Research. *Nanomaterials.* 2020 Nov 11;10(11):2236.
- [12] Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology.* 2017 Jul;32(4):266–77.
- [13] Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnol.* 2022 Jun 7;20(1):262.
- [14] Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer.* 2019 Feb;19(2):65–81.
- [15] Prasad M, Kumar R, Buragohain L, Kumari A, Ghosh M. Organoid Technology: A Reliable Developmental Biology Tool for Organ-Specific Nanotoxicity Evaluation. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sep 23;9:696668.
- [16] Fang Y, Eglen RM. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discovery.* 2017 Jun;22(5):456–72.
- [17] Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol.* 2018 Jan 23;9:6.
- [18] Saydé T, El Hamoui O, Alies B, Gaudin K, Lespes G, Battu S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials.* 2021 Feb 13;11(2):481.
- [19] Bielecka ZF, Maliszewska-Olejniczak K, Safir IJ, Szczylik C, Czarnecka AM. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research: 3D cell culture models in CSCs research. *Biol Rev.* 2017 Aug;92(3):1505–20.
- [20] Sokolova V, Ebel J, Kollenda S, Klein K, Kruse B, Veltkamp C, et al. Uptake of Functional Ultrasmall Gold Nanoparticles in 3D Gut Cell Models. *Small.* 2022 Aug;18(31):2201167.
- [21] Haisler WL, Timm DM, Gage JA, Tseng H, Killian TC, Souza GR. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. *Nat Protoc.* 2013 Oct;8(10):1940–9.
- [22] Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 2020 Mar 6;7:33.
- [23] Fontoura JC, Viezzer C, dos Santos FG, Ligabue RA, Weinlich R, Puga RD, et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering: C.* 2020 Feb;107:110264.

- [24] Foglietta F, Canaparo R, Muccioli G, Terreno E, Serpe L. Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids. *Life Sciences*. 2020 Aug;254:117784.
- [25] Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*. 2015 Jan;17(1):1–15.
- [26] Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *IJMS*. 2020 Aug 28;21(17):6225.
- [27] Le VM, Lang MD, Shi WB, Liu JW. A collagen-based multicellular tumor spheroid model for evaluation of the efficiency of nanoparticle drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016 Feb 17;44(2):540–4.
- [28] Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *aoms* [Internet]. 2016 [cited 2023 Apr 4]; Available from: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/aoms.2016.63743>
- [29] Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer KL, et al. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. Cordes N, editor. *PLoS ONE*. 2013 Mar 26;8(3):e59689.
- [30] Adcock AF. Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro Evaluation of Anticancer Drugs. *J Anal Bioanal Tech* [Internet]. 2015 [cited 2023 May 5];06(03). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/threedimensional-3d-cell-cultures-in-cellbased-assays-for-invitro-evaluation-of-anticancer-drugs-2155-9872-1000249.php?aid=54848>
- [31] Wu Z, Guan R, Tao M, Lyu F, Cao G, Liu M, et al. Assessment of the toxicity and inflammatory effects of different-sized zinc oxide nanoparticles in 2D and 3D cell cultures. *RSC Adv*. 2017;7(21):12437–45.
- [32] Worthington P, Pochan DJ, Langhans SA. Peptide Hydrogels – Versatile Matrices for 3D Cell Culture in Cancer Medicine. *Front Oncol* [Internet]. 2015 Apr 20 [cited 2023 May 5];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2015.00092/abstract>
- [33] Rossi M, Blasi P. Multicellular Tumor Spheroids in Nanomedicine Research: A Perspective. *Front Med Technol*. 2022 Jun 15;4:909943.
- [34] Costa EC, Moreira AF, De Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*. 2016 Dec;34(8):1427–41.
- [35] Saji Joseph J, Tebogo Malindisa S, Ntwasa M. Two-Dimensional (2D) and Three-Dimensional (3D) Cell Culturing in Drug Discovery. In: Ali Mehanna R, editor. *Cell Culture* [Internet]. IntechOpen; 2019 [cited 2023 May 5]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/cell-culture/two-dimensional-2d-and-three-dimensional-3d-cell-culturing-in-drug-discovery>
- [36] Nunes AS, Barros AS, Costa EC, Moreira AF, Correia IJ. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs: NUNES et AL. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019 Jan;116(1):206–26.
- [37] Pampaloni F, Stelzer EH. Three-Dimensional Cell Cultures in Toxicology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2009 Jan;26(1):117–38.
- [38] Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2014 May;12(4):207–18.
- [39] Brajša K. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period Biol*. 2016 Mar 31;118(1):59–65.
- [40] Lee SH, Shim KY, Kim B, Sung JH. Hydrogel-based three-dimensional cell culture for organ-on-a-chip applications. *Biotechnol Progress*. 2017 May;33(3):580–9.
- [41] Yosef A, Kossover O, Mironi-Harpaz I, Mauretti A, Melino S, Mizrahi J, et al. Fibrinogen-Based Hydrogel Modulus and Ligand Density Effects on Cell Morphogenesis in Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Cultures. *Adv Healthcare Mater*. 2019 Jul;8(13):1801436.
- [42] Haycock JW. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. In: Haycock JW, editor. *3D Cell Culture* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [cited 2023 May 5]. p. 1–15. (Methods in Molecular Biology; vol. 695). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-984-0_1

- [43] Hickman JA, Graeser R, De Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, et al. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnology Journal*. 2014 Sep;9(9):1115–28.
- [44] Wen Z, Liao Q, Hu Y, You L, Zhou L, Zhao Y. A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. *Braz J Med Biol Res*. 2013 Jul;46(7):634–42.
- [45] Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, et al. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports*. 2015 Apr;33(4):1837–43.
- [46] Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, et al. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res*. 2009 Apr 15;69(8):3364–73.
- [47] Colella G, Fazioli F, Gallo M, De Chiara A, Apice G, Ruosi C, et al. Sarcoma Spheroids and Organoids—Promising Tools in the Era of Personalized Medicine. *IJMS*. 2018 Feb 21;19(2):615.
- [48] Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications: 3D CELL CULTURE SYSTEMS. *J Cell Physiol*. 2015 Jan;230(1):16–26.
- [49] Behzadi S, Vatan NM, Lema K, Nwaobasi D, Zenkov I, Abadi PPSS, et al. Flat Cell Culturing Surface May Cause Misinterpretation of Cellular Uptake of Nanoparticles. *Adv Biosys*. 2018 Jun;2(6):1800046.
- [50] Bromma K, Chithrani DB. Advances in Gold Nanoparticle-Based Combined Cancer Therapy. *Nanomaterials*. 2020 Aug 26;10(9):1671.
- [51] Fratoddi I, Venditti I, Cametti C, Russo MV. The puzzle of toxicity of gold nanoparticles. The case-study of HeLa cells. *Toxicol Res*. 2015;4(4):796–800.
- [52] Park YS, Liz-Marzán LM, Kasuya A, Kobayashi Y, Nagao D, Konno M, et al. X-Ray Absorption of Gold Nanoparticles with Thin Silica Shell. *J nanosci nanotechnol*. 2006 Nov 1;6(11):3503–6.
- [53] Sani A, Cao C, Cui D. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2021 Jul;26:100991.
- [54] J. Yang C, B. Chithrani D. Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles for Improved Therapeutics. *CTMC*. 2015 Oct 8;16(3):271–80.
- [55] Mendes R, Pedrosa P, Lima JC, Fernandes AR, Baptista PV. Photothermal enhancement of chemotherapy in breast cancer by visible irradiation of Gold Nanoparticles. *Sci Rep*. 2017 Sep 7;7(1):10872.
- [56] Li W, Cao Z, Liu R, Liu L, Li H, Li X, et al. AuNPs as an important inorganic nanoparticle applied in drug carrier systems. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019 Dec 4;47(1):4222–33.
- [57] Bhumkar DR, Joshi HM, Sastry M, Pokharkar VB. Chitosan Reduced Gold Nanoparticles as Novel Carriers for Transmucosal Delivery of Insulin. *Pharm Res*. 2007 Jun 22;24(8):1415–26.
- [58] Rane TD, Armani AM. Two-Photon Microscopy Analysis of Gold Nanoparticle Uptake in 3D Cell Spheroids. Baptista PV, editor. *PLoS ONE*. 2016 Dec 9;11(12):e0167548.
- [59] Chithrani DB, Jelveh S, Jalali F, van Prooijen M, Allen C, Bristow RG, et al. Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat Res*. 2010 Jun;173(6):719–28.
- [60] Cruje C, Yang C, Uertz J, van Prooijen M, Chithrani BD. Optimization of PEG coated nanoscale gold particles for enhanced radiation therapy. *RSC Adv*. 2015;5(123):101525–32.
- [61] Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nature Nanotech*. 2010 Apr;5(4):291–6.
- [62] Chen Y, Yang J, Fu S, Wu J. Gold Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *IJN*. 2020 Nov;Volume 15:9407–30.
- [63] Musielak M, Boś-Liedke A, Piwocka O, Kowalska K, Markiewicz R, Szymkowiak B, et al. The Role of Functionalization and Size of Gold Nanoparticles in the Response of MCF-7 Breast Cancer Cells to Ionizing Radiation Comparing 2D and 3D In Vitro Models. *Pharmaceutics*. 2023 Mar 7;15(3):862.
- [64] Wang Y, Wang F, Chen Z, Song M, Yao X, Jiang G. *In situ* High-Throughput Single-Cell Analysis Reveals the Crosstalk between Nanoparticle-Induced Cell Responses. *Environ Sci Technol*. 2021 Apr 20;55(8):5136–42.
- [65] Guo F, Jiao Y, Du Y, Luo S, Hong W, Fu Q, et al. Enzyme-responsive nano-drug delivery system for combined antitumor therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022 Nov;220:1133–45.

- [66] Nehmé A, Varadarajan P, Sellakumar G, Gerhold M, Niedner H, Zhang Q, et al. Modulation of docetaxel-induced apoptosis and cell cycle arrest by all- trans retinoic acid in prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2001 Jun 5;84(11):1571–6.
- [67] François A, Laroche A, Pinaud N, Salmon L, Ruiz J, Robert J, et al. Encapsulation of Docetaxel into PEGylated Gold Nanoparticles for Vectorization to Cancer Cells. *ChemMedChem*. 2011 Nov 4;6(11):2003–8.
- [68] Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2004 Jul;59(4):928–42.
- [69] Godet I, Doctorman S, Wu F, Gilkes DM. Detection of Hypoxia in Cancer Models: Significance, Challenges, and Advances. *Cells*. 2022 Feb 16;11(4):686.
- [70] Ideker T, Lauffenburger D. Building with a scaffold: emerging strategies for high- to low-level cellular modeling. *Trends in Biotechnology*. 2003 Jun;21(6):255–62.
- [71] Mó I, Sabino IJ, Melo-Diogo D de, Lima-Sousa R, Alves CG, Correia IJ. The importance of spheroids in analyzing nanomedicine efficacy. *Nanomedicine*. 2020 Jun;15(15):1513–25.
- [72] Bromma K, Alhussan A, Perez MM, Howard P, Beckham W, Chithrani DB. Three-Dimensional Tumor Spheroids as a Tool for Reliable Investigation of Combined Gold Nanoparticle and Docetaxel Treatment. *Cancers*. 2021 Mar 23;13(6):1465.
- [73] Huang K, Ma H, Liu J, Huo S, Kumar A, Wei T, et al. Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors *in Vivo*. *ACS Nano*. 2012 May 22;6(5):4483–93.
- [74] Bugno J, Poellmann MJ, Sokolowski K, Hsu H jui, Kim DH, Hong S. Tumor penetration of Sub-10 nm nanoparticles: effect of dendrimer properties on their penetration in multicellular tumor spheroids. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2019 Oct;21:102059.
- [75] Xie X, Liao J, Shao X, Li Q, Lin Y. The Effect of shape on Cellular Uptake of Gold Nanoparticles in the forms of Stars, Rods, and Triangles. *Sci Rep*. 2017 Jun 19;7(1):3827.
- [76] Huo S, Jin S, Ma X, Xue X, Yang K, Kumar A, et al. Ultrasmall Gold Nanoparticles as Carriers for Nucleus-Based Gene Therapy Due to Size-Dependent Nuclear Entry. *ACS Nano*. 2014 Jun 24;8(6):5852–62.
- [77] Nambara K, Niikura K, Mitomo H, Ninomiya T, Takeuchi C, Wei J, et al. Reverse Size Dependences of the Cellular Uptake of Triangular and Spherical Gold Nanoparticles. *Langmuir*. 2016 Nov 29;32(47):12559–67.
- [78] Jin S, Ma X, Ma H, Zheng K, Liu J, Hou S, et al. Surface chemistry-mediated penetration and gold nanorod thermotherapy in multicellular tumor spheroids. *Nanoscale*. 2013;5(1):143–6.
- [79] Kim JA, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nature Nanotech*. 2012 Jan;7(1):62–8.
- [80] Ubaldi C, Bonacchi D, Lorenzi G, Hermanns MI, Pohl C, Baldi G, et al. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Part Fibre Toxicol*. 2009;6(1):18.
- [81] Díez-Pascual AM. Surface Engineering of Nanomaterials with Polymers, Biomolecules, and Small Ligands for Nanomedicine. *Materials*. 2022 Apr 30;15(9):3251.
- [82] Li X, Hu Z, Ma J, Wang X, Zhang Y, Wang W, et al. The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018 Jul;167:260–6.
- [83] Jia YP, Ma BY, Wei XW, Qian ZY. The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chinese Chemical Letters*. 2017 Apr;28(4):691–702.
- [84] Musielak M, Boś-Liedke A, Piotrowski I, Kozak M, Suchorska W. The Role of Gold Nanorods in the Response of Prostate Cancer and Normal Prostate Cells to Ionizing Radiation—In Vitro Model. *IJMS*. 2020 Dec 22;22(1):16.
- [85] Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. *SLAS Discovery*. 2004 Jun;9(4):273–85.
- [86] Zhang. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *IJN*. 2010 Sep;771.
- [87] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA A Cancer J Clinicians*. 2023 Jan;73(1):17–48.