

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Anna Košková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

3D kultivace buněk

Bakalářská práce

2024

Anna Košková

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

3D Cultivation of Cells

Bachelor Thesis

2024

Anna Košková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Anna Košková**
Osobní číslo: **C21281**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **3D kultivace buněk**
Téma práce anglicky: **3D Cultivation of Cells**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte bakalářskou práci na téma 3D kultivace buněčných kultur *in vitro* a moderní trendy ve 3D kultivaci buněk. V úvodní části práce se věnujte obecným možnostem kultivace buněk *in vitro* a porovnejte rozdíly, výhody a nevýhody 2D a 3D kultivace.
2. V hlavní části bakalářské práce popište možnosti 3D kultivace. Z metod 3D kultivace, které nepotřebují buněčné nosiče, se podrobněji věnujte zejména metodě visící kapky. V rámci 3D kultivace buněk na nosičích popište využití přírodních a syntetických scaffoldů, definujte vlastnosti a typy hydrogelů, porovnejte výhody a nevýhody jednotlivých typů buněčných nosičů. V závěrečné části práce se věnujte aktuálním trendům v oblasti 3D kultivace buněk, přičemž vyzdvihněte možnosti 3D tisku scaffoldů včetně přímého biotisku buněčných kultur.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Lenka Tichá**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem 3D kultivace buněk jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 6. 2024

Anna Košková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Lence Tiché za jejich odborné vedení, vstřícný přístup, cenné rady a čas, který mi v průběhu psaní věnovali. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kristíně Nešporové, Ph.D. za příležitost nahlédnout do cytologické laboratoře a blíže se seznámit s kultivací buněk. Děkuji také Ing. Kateřině Čermák Šraitrové, Ph.D. a Ing. Patriku Čermákovi, Ph.D. za jejich pomoc při psaní bakalářské práce. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá 3D metodami kultivace buněk, jejich základní charakterizací a porovnáním s jinými metodami. V úvodu práce jsou popsány složky extracelulární matrix a buněčná spojení, která mají zásadní vliv na růst buněk v buněčných agregátech. Následně jsou popsány metody buněčné kultivace a jejich základní porovnání ve 2D a 3D systémech. V hlavní části je uveden detailní popis metod 3D kultivace. První skupinou jsou metody bez použití nosiče, kam se řadí metoda visící kapky, kultivace buněk na nepřilnavých substrátech a akustická levitace. Druhou skupinu pak představují metody s využitím nosiče. Do této skupiny se řadí kultivační metody využívající scaffoldy, hydrogely, bioreaktory, biotisk a orgány na čipu. Cílem práce je poskytnout čtenářům hlubší porozumění moderním přístupům v buněčné kultivaci a jejich potenciálu pro biologický a medicínský výzkum.

KLÍČOVÁ SLOVA

3D kultivace, sféroid, organoid, scaffold, biotisk, orgán na čipu

TITLE

3D Cultivation of Cells

ANNOTATION

This bachelor's thesis deals with 3D cell culture methods, their basic characterization and comparison with other methods. The thesis starts with a description of the extracellular matrix components and cell junctions that are essential for cell growth in cell aggregates. Subsequently, cell culture methods and their basic comparison in 2D and 3D systems are described. In the main part, a detailed description of 3D culture methods is given. The first group is the carrier-free methods, which include the hanging drop method, cell culture on non-adherent substrates and acoustic levitation. The second group is represented by the carrier-assisted methods. This group includes culture methods using scaffolds, hydrogels, bioreactors, bioprinting and organs-on-a-chip. The aim of this work is to provide readers with a deeper understanding of modern approaches to cell culture and their potential for biological and medical research.

KEYWORDS

3D cultivation, spheroid, organoid, scaffold, bioprinting, organ-on-a-chip

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
ÚVOD	11
1 Extracelulární matrix	12
1.1 Složení extracelulární matrix	12
1.1.1 Skleroproteiny	12
1.1.2 Glykoproteiny	13
1.1.3 Glykosaminoglykany	13
1.2 Buněčná spojení	14
2 Metody buněčné kultivace	16
2.1 2D kultivace	16
2.2 3D kultivace	16
2.3 Porovnání 2D a 3D metod kultivace	20
3 Metody 3D kultivace bez použití nosiče	22
3.1 Metoda visící kapky	22
3.2 Kultivace buněk na nepřilnavých substrátech	23
3.3 Akustická levitace	24
4 Metody s využitím nosiče	26
4.1 Scaffoldy	27
4.2 Hydrogely	33
4.3 Mikronosiče	34
4.4 Bioreaktory	35
4.5 Biotisk	39
4.6 Orgány na čipu	41
ZÁVĚR	45
POUŽITÁ LITERATURA	47

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Buněčná spojení	14
Obrázek 2: Tvorba sféroиду	18
Obrázek 3: Nákres sféroиду a jeho částí	18
Obrázek 4: Biofyzikální vlastnosti a rysy 2D a 3D metod kultivace.....	21
Obrázek 5: Metoda visící kapky a vliv zakřivení na tvorbu sféroidu.....	22
Obrázek 6: Kultivace na nepřilnavém substrátu	24
Obrázek 7: Schéma stojatého vlnění mezi transduktorem a reflektorem	25
Obrázek 8: Znárodnění různých druhů nosičů	28
Obrázek 9: Lyofilizační sušení	29
Obrázek 10: Vertikální sestava pro elektrostatické zvlákňování.....	31
Obrázek 11: Pěnění plynem.....	32
Obrázek 12: Schéma třepací baňky	38
Obrázek 13: Proudění média u perfuzních bioreaktorů	39
Obrázek 14: Schéma systémů pro 3D biotisk.....	41
Obrázek 15: Mikroarchitektura orgánu na čipu	43

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2D	dvourozměrný
3D	trojrozměrný
CAD	počítačem podporovaný design
CO ₂	oxid uhličitý
ECM	extracelulární matrix
GAG	glukosaminoglykany
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky
JAM	junkční adhezní molekuly
NASA	Národní úřad pro letectví a vesmír
NH ₃	amoniak
NH ₄ HCO ₃	hydrogenuhličitan amonný
PCL	poly(ε-kaprolakton)
PEG	polyetylenglykol
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny polyglykolové
PNIPAAm	poly(N-isopropylakrylamid)
poly-HEMA	poly(2-hydroxyethyl metakrylát)
PVA	polyvinylalkohol
RP	rychlé prototypování
RWV	bioreaktor s rotující stěnou
ULA	povrch s velmi nízkou adhezivitou

ÚVOD

Buněčné kultury jsou nepostradatelným nástrojem *in vitro*, který slouží ke zlepšení našeho vnímání a pochopení buněčné biologie, morfologie tkání a mechanismů onemocnění. Zároveň jsou důležitým a nezbytným prvkem v průběhu preklinických studií při procesu objevování a vývoje léčiv, výzkumu rakoviny a studiu kmenových buněk. Většina buněčných linií se v současnosti kultivuje pomocí dvourozměrných (2D) metod, které na poli biologických studií stále dominují. V posledních letech ale výrazně vzrostla poptávka po trojrozměrných (3D) buněčných modelech, které dnes částečně nahrazují tradiční 2D metody. Důvodem je, že 3D buněčné kultury dokáží mnohem lépe napodobit prostředí *in vivo* a umožňují buňkám mezi sebou lépe komunikovat. To napomáhá diferenciaci buněk, vytváření složitějších struktur a usnadnění vývojových procesů. Díky tomu se zlepšuje fyziologická relevance experimentů prováděných *in vitro* a lze tak získat přesnější údaje o interakcích mezi buňkami, metabolických procesech či vlastnostech nádorů.

Metody 3D kultivace buněk se dělí na metody bez použití nosiče a metody s využitím nosiče. Mezi metody bez použití nosiče se řadí například metoda visící kapky, která využívá kapku buněčné suspenze, ve které se buňky samovolně seskupují a utváří agregáty. Další metodou je kultivace buněk na nepřilnavých substrátech, kde buňky rostou na speciálních površích, které podporují tvorbu trojrozměrných struktur nebo akustická levitace, při níž buňky levitují v médiu. Naopak metody s využitím nosiče zahrnují metody využívající scaffoldy, což jsou trojrozměrné struktury vyrobené z biologicky kompatibilních materiálů, které podporují růst a diferenciaci buněk. Za nosiče jsou považovány také hydrogely a pevné porézní či vláknité scaffoldy z přírodních nebo syntetických polymerů. Tyto materiály jsou následně využívány i ve složitějších systémech, jako jsou například bioreaktory, orgány na čipu nebo v rámci biotisku. Každá z těchto metod nabízí specifické výhody a aplikační možnosti, které se mohou použít v různých oblastech biomedicínského výzkumu a vývoje, v závislosti na specifických požadavcích na typ studované tkáně, požadovanou funkční a strukturální složitost a dostupné technické vybavení.

1 Extracelulární matrix

Extracelulární matrix (ECM) je mezibuněčná hmota, která je produkována buňkami a její vznik byl klíčový pro vývoj mnohobuněčných organismů. Utváří se kolem většiny živočišných buněk, které se následně mohou formovat do tkání a orgánů. Strukturální integrita tkání je zajištěna třemi mechanismy adheze, a to adhezí mezi buňkami, adhezí mezi buňkami a ECM a vazbou mezi molekulami ECM. Tato složitá trojrozměrná bílkovinná síť plní řadu důležitých funkcí. Pasivní funkcí ECM je to, že slouží jako mechanická a strukturní opora pro uchycení buněk. Aktivně se pak podílí na mezibuněčné komunikaci a regulaci mnoha buněčných procesů včetně růstu, migrace, diferenciaci, udržení homeostázy a morfogeneze (Theocharis et al. 2016).

1.1 Složení extracelulární matrix

Mezi hlavní složky ECM se řadí skleroproteiny, glykoproteiny a glykosaminoglykany (Theocharis et al. 2016). Přesné složení ECM se v závislosti na druhu tkáně mění a do značné míry určuje její mechanické vlastnosti. Ve vazech nebo šlachách je pružná, ale v kostech, kde musí odolávat stlačení, obsahuje navíc minerální složky, které ji zpevňují (Alcorta-Sevillano et al. 2020).

1.1.1 Skleroproteiny

Kolagen je nejhojněji zastoupenou bílkovinou u živočichů a tvoří přibližně 25 až 30 % hmotnosti lidských bílkovin. Jedná se o skleroprotein skládající se ze tří polypeptidových řetězců α , které formují trojitou šroubovici. U obratlovců se 46 různých kolagenových řetězců skládá do 28 různých typů kolagenu a mezi ty nejznámější patří typy I až IV. Kolagen I. typu představuje více než 90 % kolagenu v lidském těle a je hlavní složkou orgánů, volných pojivových tkání, kostí, šlach a kůže (Sun 2021). Tento typ kolagenu se využívá například při kultivaci ve scaffoldu, kde ve formě povlaku napomáhá buňkám adherovat k povrchu. Kolagen II. typu není tak hojně rozšířen, ale je nepostradatelnou složkou chrupavek a rohovky. Kolagen III. typu je hlavní formou kolagenu ve stěnách cév a kolagen IV. typu je hlavní složkou bazální membrány, která odděluje epitel a pod ním ležící tkáň. Kolagen je produkován fibroblasty, ale mohou jej syntetizovat také endotelové a epitelové buňky (Kular et al. 2014).

Elastin je další vláknitou bílkovinou, jejíž úloha je úzce spjata s kolagenem. Je významnou složkou některých měkkých tkání, které se opakovaně natahují a smršťují, jako jsou například šlachy, stěny cév, kůže a plíce. Zajišťuje pružnost, pevnost v tahu a je rozhodující pro jejich dlouhodobou funkci. Elastin hraje také důležitou roli v buněčné

adhezi, migraci buněk a má schopnost účastnit se buněčné signalizace. Společně s fibrilinem a řadou dalších matrixových proteinů je hlavní složkou elastických vláken. Tato vlákna jsou tvořena z jednotlivých podjednotek tropoelastinu, prekursorů elastinu, které jsou zesíťovány společně s mikrofibrily fibrilinu na vnější straně. Proteiny elastických vláken jsou kriticky důležité pro vývoj a homeostázu elastických tkání, a to jak při propojování buněk a makromolekul matrix, tak při extracelulární regulaci růstových faktorů z rodiny TGF β (Godwin et al. 2019).

1.1.2 Glykoproteiny

Glykoproteiny významně přispívají k tomu, že je ECM soudržnou sítí molekul. Glykoproteiny zprostředkovávají spojení strukturních molekul mezi sebou a také spojují strukturní molekuly a buňky. V každé molekule glykoproteinu je několik domén, které vážou různé molekuly a dohromady vytvářejí molekulární síť. Fibronektiny jsou glykoproteiny složené ze dvou polypeptidů spojených disulfidovými můstky. Každý monomer se skládá ze tří typů opakujících se podjednotek. Protein existuje ve dvou různých formách. Buď jako součást krevní plazmy, kde je jednou z prvních složek dodávaných do místa poranění, nebo jako buněčný protein, který je vytvářen fibroblasty. Fibronektiny jsou multiadhezivní a mohou pomocí několika molekulárních domén rozpoznat a vázat glykosaminoglykany, proteoglykany, fibrin, heparin a některé transmembránové proteiny, jako jsou integriny. Integrin $\alpha 5\beta 1$ je hlavním receptorem, který se podílí na procesu sestavování fibronektinové matrix, a ta se následně propojuje s aktinovým cytoskeletem buněk (Kular et al. 2014).

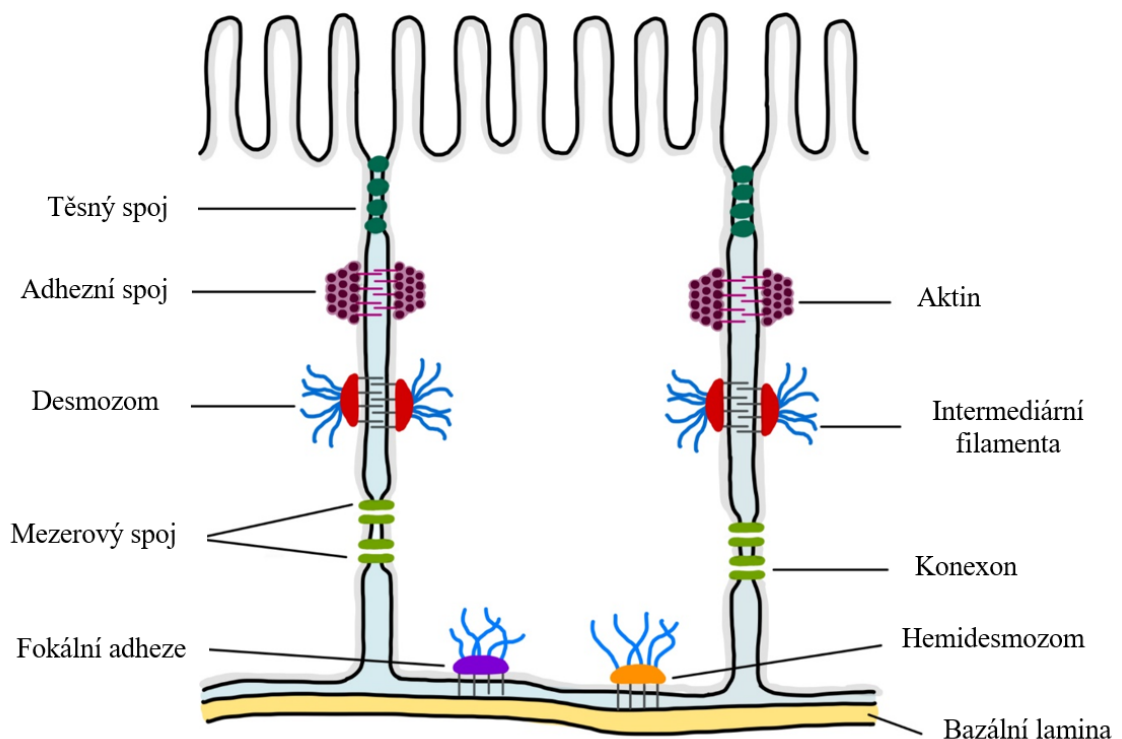
1.1.3 Glykosaminoglykany

Proteoglykany se skládají z bílkovinného jádra, na které jsou kovalentně navázány postranní řetězce glykosaminoglykanů (GAG). GAG jsou lineární negativně nabitě polysacharidy složené z opakujících se disacharidových jednotek. Na základě struktury a úrovně sulfatace opakujícího se disacharidu lze GAG obecně rozdělit do čtyř skupin, které zahrnují heparan sulfát, chondroitin sulfát, keratan sulfát a kyselinu hyaluronovou. Vysoce záporně nabitě řetězce GAG umožňují proteoglykanům zadržovat vodu a dvojmocné kationty, což jim umožňuje fungovat jako výplň volného prostoru a zajištění lubrikace. Kromě toho plní sulfoskupiny v řetězcích GAG klíčovou roli tím, že umožňují interakce s růstovými faktory, receptory na povrchu buněk, enzymy, cytokiny, chemokiny a proteiny. Molekuly GAG jsou spojeny s několika klíčovými biologickými procesy, jako je vývoj, růst, buněčná signalizace, angiogeneze a diferenciací mezenchymálních kmenových buněk. Tyto vlastnosti činí z těchto biomolekul slibné materiály pro širokou škálu aplikací ve tkáňovém inženýrství,

kdy se například GAG s kyselinou hyaluronovou či chondroitinem sulfátem, které se nachází převážně v chrupavkách, využívají jako materiály pro výrobu scaffoldů, kde napodobují přirozenou ECM a zlepšují kvalitu vytvářené tkáně (Silva et al. 2019).

1.2 Buněčná spojení

Většina buněk ve tkáních je navzájem propojena pomocí specializovaných kontaktních míst, která se nazývají buněčná spojení. Ta mají zásadní význam pro vzájemnou komunikaci a adhezi mezi buňkami a buňkami s ECM, čímž ovlivňují morfogenezi, homeostázu, diferenciaci a buněčný růst. V závislosti na své strukturální a funkční specializaci lze buněčná spojení kategorizovat do dvou hlavních skupin: spojů mezi buňkami a spojů mezi buňkami a ECM (Obrázek 1). Dále je rozdělujeme do tří tříd na: okluzivní, také známé jako těsné spoje, kotvící neboli adhezní spoje a komunikační spoje. Každý typ spojení využívá specifické molekuly adheze a signálních cest, které jsou esenciální pro specifické biologické procesy a integritu multi-buněčných systémů (Alberts 2002).



Obrázek 1: **Buněčná spojení** – upraveno dle (Alberts 2002).

Těsné spoje (*zonula occludens*) pevně ukotvují buňky k sobě, čímž vytvářejí souvislou bariéru pro difuzi a omezují pohyb některých membránových proteinů a lipidů mezi apikální a bazolaterální oblastí plazmatické membrány. Mají zásadní význam pro udržování rozdílů v koncentraci malých hydrofilních molekul napříč buněčnými vrstvami epitelu a endotelu.

Základními složkami těsných spojů jsou okcludin, klaudin a junkční adhezní molekuly (JAM). Jedná se o dynamické proteinové struktury, které jsou regulovány procesem fosforylace, schopné adaptace na různé fyziologické podmínky (Brücher a Jamall 2014).

Hlavními typy kotevních spojů ve tkáních jsou adhezní spoje (*zonula adherens*), desmozomy (*macula adherens*), fokální adheze a hemidesmozomy. Vznik kotevních spojů je klíčovým pro utvoření těsných spojů, které by jinak nemohly vznikat. Adhezní spoje jsou základním typem mezibuněčného spojení a jsou tvořeny transmembránovými adhezními proteiny kadheriny. Adheze skrze tyto proteiny je závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů. Vápník přímo podporuje adhezivní schopnosti kadherinů tím, že posiluje vazby mezi kadherinovými molekulami na povrchu sousedních buněk. Přes katenin se kadheriny následně váží na aktinová filamenta. Existuje několik tkáňově specifických kadherinů, z nichž nejběžnějším je E-kadherin, který je exprimován především v epiteliálních buňkách. Kadheriny mají důležitou roli při přímém ukotvení kmenových buněk k buňkám niche, řídí orientaci buněčného dělení, regulují signální dráhy a snižují mezipovrchové napětí při vytváření spojení mezi buňkami (Adil et al. 2021). Obdobně jako adhezní spoje, i desmozomy vytváří intercelulární spojení za pomoci kadherinů. Konkrétně se jedná o jejich poddruhy desmogleiny a desmokoliny. Tyto neklasické kadheriny vykazují při nedostatku vápníku hyperadhezivitu a váží se na intermediární filamenta cytoskeletu. Tvoří velmi pevná spojení, a mají tak zásadní roli ve tkáních vystavených intenzivnějším mechanickému namáhání (Kowalczyk a Green 2013). Některé kotevní spoje, jako jsou hemidesmozomy a fokální adheze, váží buňky spíše k ECM než k jiným buňkám. Hemidesmozomy se stavbou a funkcí podobají desmozomům, ale připojení k intermediárním filamentům zde zprostředkovávají rozdílné adhezivní transmembránové proteiny zvané integriny. Fokální adheze umožňují uchycení buněk na ECM prostřednictvím integrinů, které se intracelulárně spojují s aktinovými filamenty (Alberts 2002).

Účelem komunikačních spojení není adheze k buňkám, ale pouze zajištění přímého spojení s cytoplazmou sousedících buněk. Zprostředkovávají rychlý mezibuněčný transport iontů a malých molekul, které se podílejí na autokrinní a parakrinní regulaci buněčného metabolismu. Molekuly se pohybují podél koncentračních gradientů mezi spojenými buňkami. Příkladem takového spojení jsou mezerové spoje (*gap junctions, nexus*), které jsou tvořeny pomocí membránových kanálků, tzv. konexonů. Tyto hexamerní kanálky jsou zprostředkovány specifickými proteiny zvanými konexiny a vystupují do extracelulárního prostoru. Zde se dva konexony ze sousedních buněk spojí a sestaví jeden kompletní mezibuněčný kanál (Alberts 2002).

2 Metody buněčné kultivace

Buněčná kultura je *in vitro* systém, v němž se buňky, tkáně nebo orgány pěstují v umělém prostředí, které poskytuje podmínky nezbytné pro jejich život a růst. Kultivace buněk *in vitro* představuje klíčový nástroj v moderním biologickém výzkumu a umožňuje vědcům pozorovat buňky v kontrolovaných podmínkách, což napomáhá hlubšímu pochopení buněčných procesů a mechanismů, které ovlivňují jejich funkci a chování (Duval et al. 2017). Za průkopníka buněčných kultur je považován Ross Harrison, který roku 1907 poprvé demonstroval možnost kultivovat a pozorovat růst nervových vláken žáby pomocí metody visící kapky. Od té doby byla metoda kultivace zdokonalena a buněčné kultury se staly jedním z hlavních nástrojů dnešních přírodních věd (Kapałczyńska et al. 2018).

2.1 2D kultivace

2D buněčné kultury jsou široce používanou *in vitro* technikou, při níž jsou buňky kultivovány na rovinném povrchu a utváří na dně kultivační nádoby monovrstvu. Tyto nádoby mohou být vyrobeny z různých plastových materiálů nebo skla a jejich vnitřní povrch, který je ve styku s buňkami, může být upraven tak, aby zlepšil jejich přilnavost (Basu et al. 2021). Hlavní výhoda 2D kultur spočívá v jejich jednoduchosti a reprodukovatelnosti. Umožňují snadné pozorování a manipulaci s buňkami, takže jsou vhodné pro vysoce výkonný screening a základní buněčné studie. Navzdory těmto výhodám postrádají 2D kultury prostorovou komplexnost a mechanické podněty přítomné *in vivo*, což může vést k významným rozdílům v chování buněk, jejich diferenciaci a genové expresi ve srovnání s 3D kulturami (Duval et al. 2017).

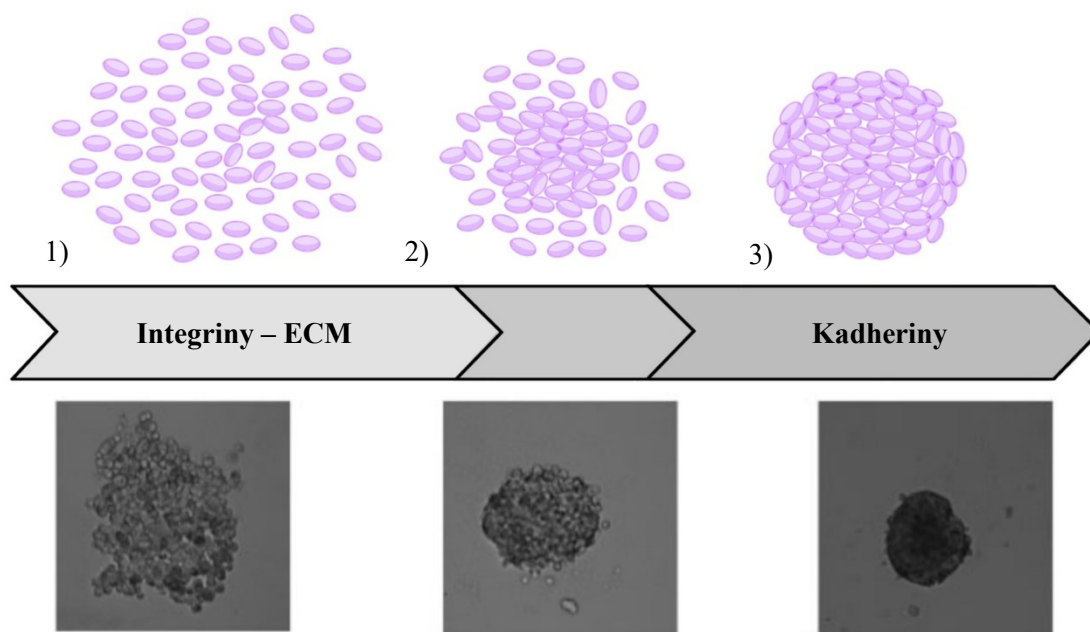
2.2 3D kultivace

Ross Harrison svou metodou visící kapky položil základy kultivace buněk. Avšak skutečný rozvoj 3D kultivace byl umožněn až díky práci Anne W. Hamburger a Sydney E. Salmona, kteří v 70. letech 20. století využili agarové médium ke 3D kultivaci nádorových kmenových buněk. Od té doby byly dobře popsány a zdokumentovány nápadné podobnosti mezi morfologií a chováním buněk rostoucích v nádorové hmotě a buněk kultivovaných pomocí 3D metod (Hamburger a Salmon 1977).

3D buněčná kultura je kultivační systém, v němž je mimo tělo uměle vytvořeno prostředí podobné prostředí *in vivo*, které umožňuje buňkám růst všemi směry a interagovat s okolním (Lee et al. 2023). K utváření tohoto vhodného kultivačního prostředí se využívá nepřehledného množství materiálů, technologických postupů a metod, ze kterých si musí vědci vybrat tu, která bude pro jejich kultivované buňky nejvhodnější. Neexistuje žádná univerzální

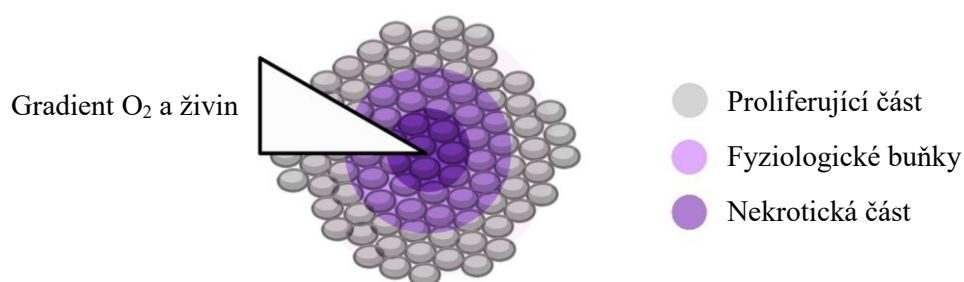
metoda, která by dokonale splňovala požadavky pro jednotlivé buněčné kultury (Knight a Przyborski 2015). Celkově můžeme tyto metody rozdělit do dvou základních skupin. Buňky mohou být kultivovány bez použití scaffoldu nebo s použitím scaffoldu, což je určitý druh nosiče, který poskytuje strukturální podporu pro uchycení buněk a následný vývoj trojrozměrné tkáně. Buňky mohou být uchyceny na povrchu scaffoldu, uvnitř nebo vytvářet samostatné buněčné agregáty. Agregáty vytvořené shromážděním mnoha buněk klasifikujeme v závislosti na jejich původu, typu a funkci v rámci 3D uspořádání na sféroidy a organoidy (Lee et al. 2023).

Sféroidy jsou těsně uspořádané shluky buněk, které jsou následně kultivovány jako volně plovoucí v médiu. Pro tvorbu sféroidu se využívají především nádorové buněčné linie, které lze v kultuře množit neomezeně dlouho a vytvářet tak velké množství sféroidů pro experimentální účely (El Harane et al. 2023). Buňky se formují pomocí vláken ECM jako je kolagen a GAG. Tvorby sféroidů se dále účastní i různé růstové faktory a cytokiny, které ovlivňují proliferaci a diferenciaci buněk. Buňky mezi sebou vzájemně komunikují, například pomocí těsných spojů, což ovlivňuje jejich odpověď na testované látky a blíže napodobuje prostředí *in vivo*. Tvorba sféroidů probíhá ve třech fázích (Obrázek 2). V první fázi dochází k adhezi. Původně rozptýlené buňky v suspenzi se začnou pomocí dlouhých vláken ECM shlukovat. Hlavní úlohu v této fázi mají povrchové integriny, což jsou transmembránové proteiny, které se podílejí na vytváření mezibuněčných spojů. Po adhezi následuje fáze prodlevy, kdy dochází ke zvýšení exprese a akumulace kadherinů, které zodpovídají za buněčnou adhezi. Poslední fází tvorby sféroidu je kompaktace, v průběhu které dochází k tvorbě homofilických vazeb mezi kadheriny na sousedních buňkách (Lin a Chang 2008).



Obrázek 2: **Tvorba sféroиду:** 1) fáze shlukování buněk, 2) fáze prodlevy a akumulace kadherinů, 3) fáze kompaktace – upraveno dle (Lin a Chang 2008).

Sféroidy se používají jako modely pro hodnocení citlivosti a rezistence na léčiva a jsou obvykle odolnější vůči chemoterapii a radioterapii ve srovnání s buňkami kultivovanými jako 2D monovrstvy (Singh et al. 2020). Ve sféroidech s průměrem větším než 400-500 μm dochází k nedokonalé výměně živin a kyslíku, která je v této struktuře založena pouze na pasivní difúzi. Buňky, které se nachází ve středu sféroidu, v důsledku nedostatku pro život potřebných látek odumírají a vznikají tak nekrotická jádra (Obrázek 3) (Mehta et al. 2012). Podobně tomu je tak i u některých druhů nádorů, kde se vlivem nedostatku kyslíku vytváří nekrotická ložiska nebo hypoxické oblasti. Hypoxie nádoru významně ovlivňuje výsledek léčby rakoviny radioterapií. Při radioterapii se využívá tvorby reaktivních forem kyslíku, ale oblasti, které kyslík neobsahují, jsou tak vůči záření rezistentní. Zároveň bylo prokázáno, že řada chemoterapeutik je při vystavení hypoxickému prostředí méně účinná, což vede k další progresi onemocnění (Graham a Unger 2018).



Obrázek 3: **Nákres sféroidu a jeho částí** – upraveno dle (Sant a Johnston 2017).

Organoidy jsou složité shluky orgánově specifických buněk, které vykazují realistickou mikroanatomii připomínající *in vivo* orgán nebo tkáň, od které jsou odvozeny. Zároveň jsou schopny vykonávat alespoň některé funkce, kterými původní tkáň či orgán disponuje. V porovnání oproti sféroidům jsou větší, strukturálně komplexnější a složeny z více typů různých buněk (Lee et al. 2023). Organoidy se vytváří převážně z pluripotentních nebo adultních kmenových buněk, ale využívají se i buňky nádorové. Pluripotentní kmenové buňky, mezi které řadíme například embryonální kmenové buňky a indukované pluripotentní kmenové buňky, jsou schopny diferenciací do řady buněčných typů. Adultní kmenové buňky, které pocházejí z dospělých tkání, mají schopnost diferenciací na specifické typy buněk odpovídající jejich původní tkáni. Proces tvorby organoidů obvykle začíná izolací kmenových buněk nebo biopsií nádorových buněk a jejich mechanickým či enzymatickým rozdělením. Buňky jsou následně kultivovány za specifických podmínek podporujících jejich „samoorganizaci“ do organoidních struktur. Tyto podmínky zahrnují použití specifických růstových faktorů a složek ECM, bez kterých by tento proces nebyl možný. Pro tvorbu organoidů z nádorových buněk se běžně využívá jako matrice extrakt z bazální membrány, který se prodává jako komerční produkt zvaný Matrigel. Po smíchání se suspenzí buněk tento extrakt v průběhu kultivace v termostatu tuhne a vytváří trojrozměrnou strukturu, která podporuje růst a diferenciaci buněk uvnitř. Organoidy se postupně samostatně organizují do struktur připomínajících miniaturní původní orgány, což zahrnuje různé vrstvy a buněčné typy typické pro daný orgán či tkáň (El Harane et al. 2023). Jsou strukturálně komplexní a rekapitulují vývoj orgánů *in vitro*, což je činí velmi užitečnými při studiu organogeneze, dědičnosti a patologie, zejména u orgánů s malou nebo žádnou regenerační schopností, jako je například mozek (Lee et al. 2023). Mozkové organoidy napodobují růst a organizaci mozkové tkáně a slouží ke studiu vývoje mozku a neurologických onemocnění. Střevní organoidy reprezentují strukturu a funkci střeva a používají se k výzkumu střevní fyziologie a chorob. Jaterní organoidy simulují funkci jaterních buněk a umožňují studium jaterních chorob a testování léčiv. Pankreatické organoidy napodobují funkce beta buněk produkujících inzulin a jsou významné zejména pro výzkum diabetu. Organoidy také mají potenciál v personalizované medicíně, kde mohou být vytvořeny z pacientových vlastních buněk a lépe předpovědět reakci na specifickou léčbu. Dosud organoidy nedosahují velikosti skutečných orgánů, což je převážně způsobeno nedostatkem cévního zásobování. Výzkum však stále pokračuje a zdokonalování technologií může v budoucnu vést k vytvoření komplexnějších a realističtějších modelů (El Harane et al. 2023).

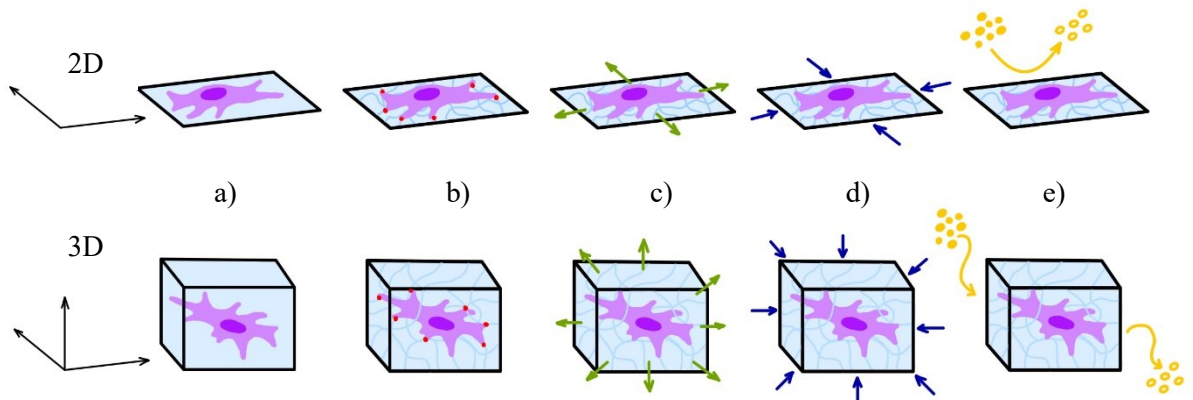
2.3 Porovnání 2D a 3D metod kultivace

Jedním z hlavních rozdílů pozorovaných při porovnávání buněk ve 2D a 3D kulturách je odlišnost v jejich morfologii. Tvar buněk ve 2D a 3D kulturách se výrazně liší v důsledku rozdílů ve fyzikálním a biochemickém prostředí, které tyto dvě kultivační metody poskytují. Ploché povrch, na který buňky ve 2D kulturách adherují, omezuje schopnost buněk interagovat s okolím a přiměje je tak, aby se rozprostřely a zaujaly zploštělý a protáhlý tvar (Obrázek 4). Naproti tomu 3D kultury poskytují komplexnější a fyziologicky relevantnější prostředí. Buňky jsou vloženy do matrice, která jim umožňuje interakci s okolím ve všech třech rozměrech, což podporuje přirozenější a prostorově uspořádanější morfologii (Duval et al. 2017). Tvar a morfologie buněk jsou neodmyslitelně spjaty s jejich polaritou, která je nezbytná pro různé buněčné procesy, včetně diferenciací, migrace a organizace tkání. Vytváření buněčné polarit ve 3D kulturách je ovlivněno i difuzí biologických faktorů, která probíhá ve 3D prostředí aktivněji a pomaleji ve srovnání s rychlou a pasivní difuzí ve 2D kulturách. Ve 2D kulturách jsou všechny buňky v přímém kontaktu s kultivačním médiem, což usnadňuje účinný příjem živin a odstraňování odpadních látek prostřednictvím jednoduché difuze. Toto uspořádání však přesně nenapodobuje složité prostředí *in vivo*, kde jsou buňky obklopeny ECM a dalšími buňkami v trojrozměrném prostoru. Naopak ve 3D buněčných kulturách je vytvořeno složitější difuzní prostředí. Živiny a odpadní produkty musí procházet ECM a několika vrstvami buněk. To vede k pomalejšímu a omezenějšímu procesu difuze ve srovnání s 2D kulturami a vzniku difuzních gradientů. Ve 3D kulturách je často nutné vytvořit perfuzní systém, který zajistí účinný přísun živin a odstraňování odpadních látek. (Sun et al. 2021).

Rozložení buněk ve fázích buněčného cyklu se může ve 2D a 3D strukturách výrazně lišit. Ve 2D kulturách buňky často vykazují rovnoměrnější rozložení buněčného cyklu s tendencí se hromadit ve specifických fázích, jako je například fáze G1. Tato uniformita je částečně způsobena omezenou prostorovou organizací a interakcí s extracelulární matrix, která může ovlivňovat průběh buněčného cyklu a míru proliferace. Naopak ve 3D kulturách jsou buňky vystaveny gradientům živin, kyslíku a signálních molekul, což vede k heterogennějšímu rozložení v různých fázích buněčného cyklu (Koshkin et al. 2017).

Mikroprostředí může ve 3D kulturách ovlivňovat chování buněk, včetně genové exprese a odpovědi na léčbu. Studie například ukázaly, že buňky pěstované ve 3D prostředí vykazují vyšší radiorezistenci ve srovnání s buňkami ve 2D kulturách, což se částečně připisuje ochranné roli mikroprostředí. To naznačuje, že 3D kultury mohou poskytnout přesnější modely

pro studium biologie nádorů a reakcí na léčbu, protože lépe kopírují komplexní interakce a strukturální vlastnosti skutečných nádorů (Antonelli 2023).



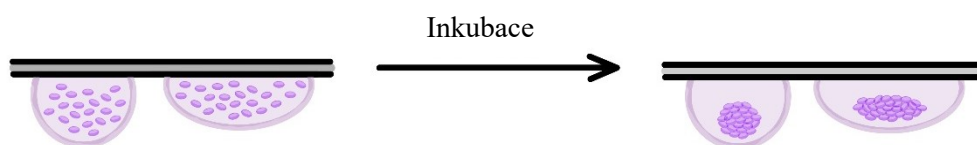
Obrázek 4: **Biofyzikální vlastnosti a rysy 2D a 3D metod kultivace:** a) orientace v prostoru, b) adheze s ECM, c) směr migrace, d) působení mechanických sil, e) difúze média – upraveno dle (Weaver a García 2019).

3 Metody 3D kultivace bez použití nosiče

Scaffold-free metody, tedy metody bez použití nosiče, můžeme dělit na pasivní a aktivní. Pasivní je založena na mezibuněčné interakci samotných buněk, které časem vytváří pevné agregáty (Lin et al. 2006). Tvorby pevných agregátů, neboli sféroidů, lze docílit metodou zavěšené kapky nebo kultivací na povrchu s velmi nízkým povrchovým napětím (Jensen a Teng 2020). Aktivní způsob využívá ultrazvuk nebo některé typy bioreaktorů, díky kterým se buňky rychleji shlukují. Většina bioreaktorů ale spadá pod metody s využitím nosiče (Ino et al. 2007). Působením vnějšího vlivu lze docílit vytvoření větších buněčných agregátů, jejichž tvorba by jinak byla velice časově náročná. Zároveň také umožňuje tvorbu heterogenních sféroidů, které by se jinak pasivně samy netvořily (Kojima et al. 2011).

3.1 Metoda visící kapky

Jedná se historicky o jednu z prvních 3D metod kultivace, která původně sloužila v mikrobiologii pro studium bakterií. Na spodní stranu víčka Petriho misky nebo do mikrotitrační destičky je nasazena suspenze buněk (20-40 μ l), která je následně přetočena o 180 stupňů. Působením povrchového napětí zůstávají kapky suspenze viset. V důsledku absence struktury, na které by mohly buňky adherovat, sedimentují ve špičce kapky a shlukují se do sféroidu. Tvorba sféroidu obvykle trvá přibližně 24 hodin, ale v závislosti na typu buněk může trvat i déle (Jeong et al. 2022). V každé kapce vzniká pouze jeden sféroid, jehož poloměr je úměrný zakřivení visící kapky. V kapce s plochým dnem, kde je velký poloměr zakřivení, rostou buňky spíše v rovině za vzniku zploštělého agregátu (Obrázek 5). Kompaktnější sféroid vzniká v zavěšené kapce s menším poloměrem zakřivení. Regulací hustoty buněčné suspenze a objemu kapky lze regulovat velikost sféroidů (Gao et al. 2019).



Obrázek 5: Metoda visící kapky a vliv zakřivení na tvorbu sféroidu – upraveno dle (Gao et al. 2019).

Tato metoda je poměrně jednoduchá a nevyžaduje použití speciálních přístrojů či drahých materiálů. Nevýhodou je obtížnost výměny kultivačního média, při které může docházet k poškození sféroidu. Zároveň je nutné udržovat stálou vlhkost prostředí, protože kapky média rychle vysychají. Pracovní a časová náročnost společně s malým objemem kapky suspenze neumožňuje kultivaci většího množství buněk (Jeong et al. 2022).

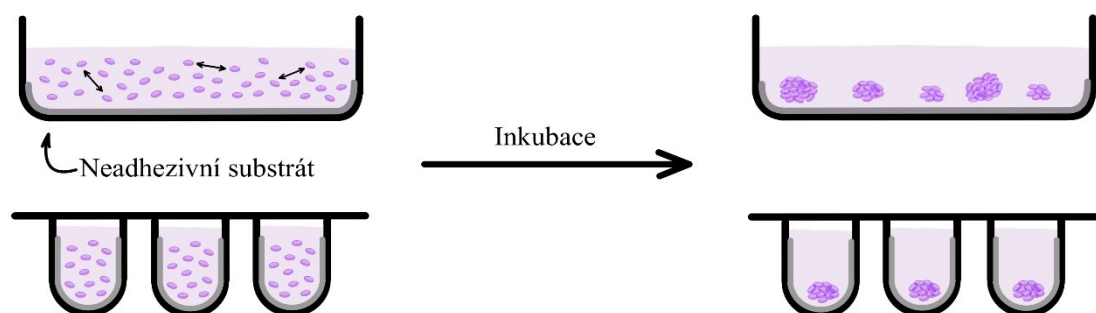
Na trhu již existuje řada komerčně dostupných destiček, které ulehčují výměnu média a pomáhají utvářet kapky o konstantní velikosti. Příkladem takových destiček jsou Akura PLUS a Perfecta3D, které lze zakoupit ve dvou velikostech s 96 a 384 jamkami. Oba produkty si jsou vzájemně podobné a skládají se ze 3 částí. Vrchní a spodní část destičky chrání plastová víka, která slouží k zachování sterility a snížení odpařování. Uprostřed se nachází hlavní kultivační destička se speciálně vytvořenými jamkami, pod kterými se vytvoří visící kapky požadované velikosti, a zároveň umožňují z vrchní strany případnou další manipulaci s kulturou. Po obvodu je dále rezervoár s vodou, který dále zabraňuje odpařování vody z média visící kapky (Tung et al. 2011).

3.2 Kultivace buněk na nepřilnavých substrátech

Principem této metody je nasazení buněk na povrch, ke kterému nemohou přilnout. Buňky spontánně agregují a vytvářejí sféroidy nad neadherentním povrchem prostřednictvím interakcí buňka – buňka. Základem je výběr kultivační nádoby s nečleněným povrchem, který se následně upravuje pomocí chemických látek. Povrch s velmi nízkou adhezivitou (ULA) lze například vytvořit pokrytím Petriho misky nebo jamek v mikrotitračních destičkách materiálem odpuzujícím proteiny. Takovými látkami jsou například agaróza, poly(2-hydroxyethyl metakrylát) (poly-HEMA), polyetylen glykol (PEG), galaktóza, polyvinylalkohol (PVA) nebo poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPAAm) (Liu et al. 2021).

Povrch, nad kterým buňky agregují, nemusí být pouze plochý, ale lze pro kultivaci využít jamek, které mají různě tvarované dno. Pro tvorbu homogenních sféroidů se využívají destičky ULA s U-dnem či V-dnem. Podobně jako u metody visící kapky i zde vlivem gravitace dochází k sedimentaci a následné agregaci buněk na dně jamky. Velikost buněčného agregátu lze snadno ovlivnit přidáním buněčné suspenze o definovaném objemu a požadované hustotě buněk. Oproti tomu destičky ULA s plochým dnem produkují větší množství heterogenních sféroidů (Obrázek 6). Buňky se v jamkách volně pohybují a náhodně tvoří agregáty, jejichž velikost a počet nelze úplně přesně ovlivnit (Shafaie et al. 2017). Více sféroidů v jedné jamce může značně ztížit získání konzistentních výsledků při experimentech. Homogenita sféroidu je například klíčová pro získání reprodukovatelných výsledků při screeningu léčiv. Menší sféroidy vykazují vyšší citlivost na léčiva, zatímco větší vykazují vyšší rezistenci, což ztěžuje přesné porovnání výsledků a ovlivňuje celkové hodnocení účinnosti léku (Han et al. 2021). V porovnání s metodou visící kapky a bioreaktoru se v destičkách ULA vytváří agregáty, které jsou méně kompaktní a citlivější na vliv chemických látek (Raghavan et al. 2016).

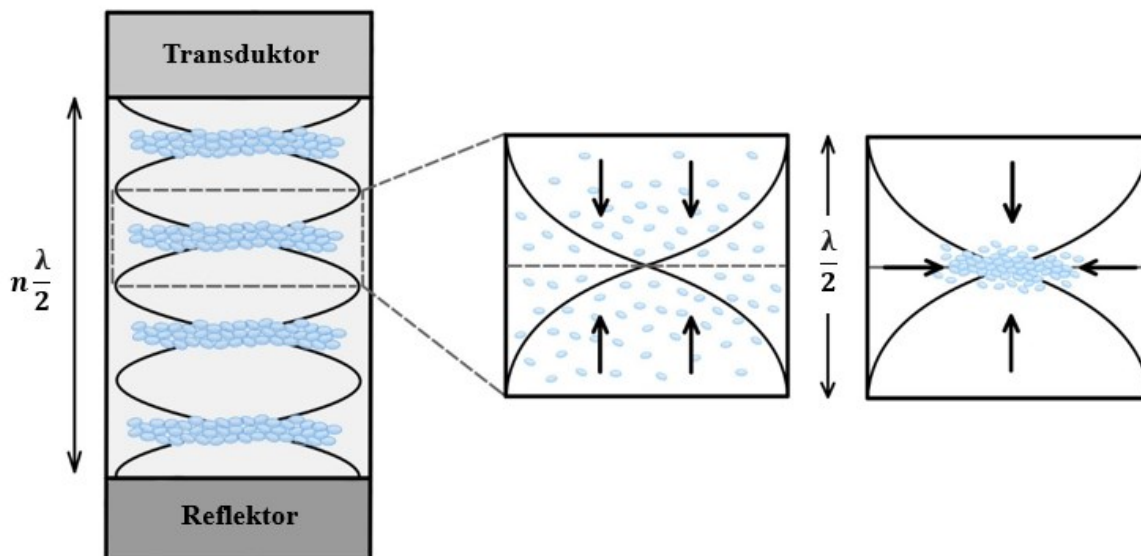
Příkladem komerčně dostupných produktů jsou Nunclon Sphera destičky výrobce Thermo Scientific a kultivační lahve od firmy Corning.



Obrázek 6: **Kultivace na nepřilnavém substrátu** – upraveno dle (Breslin a O’Driscoll 2013).

3.3 Akustická levitace

Akustická kultivace buněk je metoda, která využívá vysokofrekvenčních akustických vln k bezkontaktní manipulaci s buňkami a tvorbě sféroidů. Akustická vlna je druh mechanického vlnění a pro kultivaci se nejběžněji používá frekvence kolem 2 MHz, což je frekvence ultrazvuku. Vlny vznikají v transduktoru ultrazvuku a prochází dále médiem, kde se nakonec odrazí od reflektoru zpět na transduktor. Uvnitř kultivační nádoby tak vzniká stojaté vlnění s tlakovými kmity a uzly, jejichž počet lze regulovat řízením frekvence akustických vln. Akustické vlny ovlivňují rozložení tlaku v kapalinách a v důsledku tohoto gradientu vzniká akustická radiační síla. Tato síla následně náhodně rozmístěné buňky usměrňuje do míst, kde se nacházejí uzly akustické vlny, což jsou místa s minimální hodnotou akustického tlaku (Obrázek 7). Těmto místům se přezdívá akustické pasti. Zde mohou následně buňky agregovat a vytvářet heterogenní shluky (Seo et al. 2023).



Obrázek 7: Schéma stojatého vlnění mezi transduktorem a reflektorem (vlevo) a působení akustické radiční síly na suspenzi buněk a formování shluků (vpravo), λ – vlnová délka – upraveno dle (Jeger-Madiot et al. 2021).

Sféroidy, které se pomocí akustických vln vytváří, jsou ve velikosti a tvaru variabilní. Například mezenchymální kmenové buňky byly po 12 hodinách schopné vytvořit sféroidy o velikosti $400\mu\text{m} \pm 60\mu\text{m}$ (Jeger-Madiot et al. 2021). Sféroidy, vytvořené krátkodobým působením akustických vln, lze následně přemístit do jiného prostředí a využít například jako "bioinkoust" při biotisku. Možná je ale i varianta dlouhodobé kultivace. Viabilita buněk kultivovaných v akustických vlnách zůstává vysoká, s více než 90% přežitím po dobu až 7 dní, a neproказuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s buňkami kultivovanými v tradičních 2D podmínkách (Sriphutkiat et al. 2018). Jednou z hlavních výhod akustické kultivace je její neinvazivní charakter. To znamená, že buňky nejsou vystavovány mechanickému stresu nebo poškození, což je často nevýhodou jiných druhů kultivačních metod (Peng et al. 2020). Kapacita akustické kultivace je omezena pouze velikostí a kapacitou použitého zařízení. Moderní technologie ale umožňují kultivaci většího množství buněk než v minulosti, což dává této metodě potenciál pro aplikace v průmyslu i výzkumu (Jeger-Madiot et al. 2021).

4 Metody s využitím nosiče

Tkáňový nosič je 3D struktura, která slouží jako mechanická podpora pro kultivované buňky. Poskytuje vhodné prostředí pro jejich adhezi, proliferaci a diferenciaci, ale především poskytuje a co nejlépe napodobuje prostředí ECM *in vivo* v 3D prostoru *in vitro* prostředí. Tkáňovým nosičem jsou například scaffoldy nebo hydrogely a buňky lze kultivovat přímo na jejich povrchu nebo mohou být včleněny do jejich struktury, což umožní homogenní distribuci a interakci s nosičem z více stran (Knight a Przyborski 2015).

Nanesení buněk na scaffold může probíhat několika různými metodami, které obecně dělíme na statické a dynamické. Mezi statické metody se řadí pasivní nanášení, které je nejjednodušší a nejpoužívanější metodou, ale zároveň je to také nejméně účinný přístup. Při pasivním nanášení se buněčná suspenze pipetuje přímo do scaffoldu nebo na jeho povrch. Se scaffoldem se následně již nijak nemanipuluje a buňky se ponechají několik hodin inkubovat, než samy přilnou. Přestože se jedná o jednoduchou metodu nanášení buněk, má několik nevýhod. Nasazené buňky se po scaffoldu nerozprostírají úplně rovnoměrně a hloubka penetrace závisí na použitém materiálu a jeho pórovitosti. Dynamické metody nanášení buněk využívají techniky, které zvyšují účinnost nanesení buněk, rovnoměrnost rozprostření a usnadňují průnik buněk do scaffoldu. Toho lze docílit například pomocí bioreaktorů, konkrétně pomocí třepacích baněk, kde je scaffold pevně připevněn a kolem proudí médium s buňkami. Další metoda je založena na vnitřním či vnějším vakuovém tlaku, který nutí buněčnou suspenzi procházet skrz scaffold, kde se buňky samy přilnou. Tato metoda s tlakovým rozdílem je velice rychlá a efektivní a využívá se například u perfuzních bioreaktorů (Villalona et al. 2010). Buňky nemusí být do scaffoldu nanášeny jen pomocí tlaku, ale lze využít i působení magnetického pole či elektrostatické síly. U magnetického nanášení se musí buňky nejdříve označit pomocí magnetických částic. Jakmile jsou buňky označeny a zmagnetizovány, lze je nasměrovat na konkrétní místa na nosiči bez nutnosti přímého kontaktu. Tato metoda umožňuje přesnou kontrolu nad umístěním buněk na scaffold a může být zvláště užitečná při práci s citlivými nebo vzácnými buněčnými populacemi (Kappes et al. 2022). Další alternativní metodou je elektrostatická metoda, při které jsou buňky nanášeny na scaffold pomocí elektrostatických sil. K usměrnění pohybu buněk a jejich přichycení na požadované místo na scaffoldu se využívá elektrické pole (Villalona et al. 2010).

U hydrogelů se buňky nasazují do tekutého prekurzoru, tak aby se vytvořila suspenze. Následně je směs polymerizována, čímž se buňky v hydrogelu zapouzdří. Tento princip

nanášení buněk se využívá například u biotisku. Další metodou je nanášení buněk na povrch hydrogelového nosiče, podobně jako u statických metod scaffoldů (Caliari a Burdick 2016).

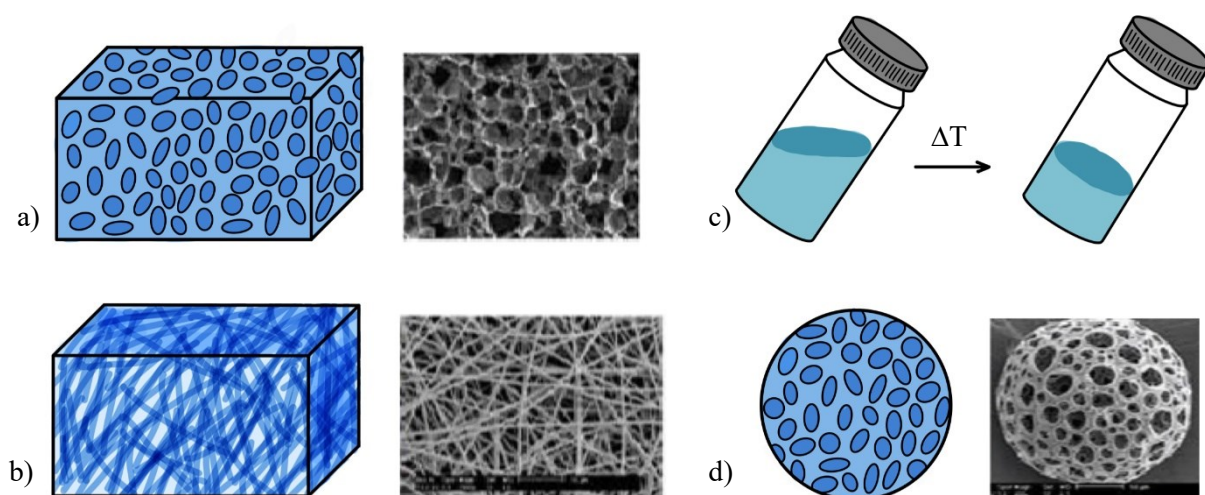
4.1 Scaffoldy

Existuje široká škála druhů scaffoldů používaných při buněčné kultivaci. Jejich vlastnosti se mohou lišit v závislosti na konkrétním účelu a aplikaci. Obecně se dle použití dělí do dvou kategorií na scaffoldy využívané ve tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně nebo pro *in vitro* laboratorní aplikace (Knight a Przyborski 2015). Jednou z vlastností, která obecně tyto dvě skupiny od sebe odlišuje, je biodegradabilita. Některé scaffoldy jsou navrženy tak, aby poskytovaly dočasnou podporu a následně v průběhu růstu buněk byly postupně odbourávány. Tyto dočasné scaffoldy mohou být vyrobeny z biomateriálů, které se postupně rozkládají například enzymatickou aktivitou. Hlavním zaměřením pro jejich použití je již zmíněná oblast regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Scaffoldy využívané pro *in vitro* laboratorní aplikace jsou veskrze navrženy tak, aby zůstaly stabilní po celou dobu buněčného růstu. Produkty rozkladu scaffoldu by mohly zapříčinit výkyvy pH, vznik odpadních látek a zároveň by si buňky po rozkladu matrice nemusely zanechat svou původní 3D konfiguraci (Echeverria Molina et al. 2021). Ve snaze napodobit přirozenou ECM byla pro vytváření scaffoldů zkoumána řada syntetických a přírodních materiálů či jejich kombinací (Knight a Przyborski 2015).

Přírodní polymery jsou netoxické, vysoce biokompatibilní látky, ke kterým buňky snadno přilnou a zlepšují jejich proliferaci a diferenciaci. Jedná se o materiály, které lze získat z přírodních zdrojů jako jsou živočichové, rostliny a mikroorganismy. Dle původu je lze dělit na biomateriály na bázi proteinů nebo na bázi polysacharidů. Jsou vhodné především pro aplikace v tkáňovém inženýrství, protože jsou biologicky odbouratelné. Mechanické vlastnosti přírodních polymerů jsou obecně dobré, ale pro zvýšení pevnosti mohou být při tvorbě scaffoldu zkombinovány s jinými materiály. Mezi nejpoužívanější proteiny se řadí kolagen, fibrin a elastin, což jsou látky, které se běžně vyskytují v ECM. Z polysacharidů se nejvíce používá celulóza, alginát, škrob složený z amylózy a amylopektinu, inulin a kyselina hyaluronová. Přírodní polymery tvoří nedílnou součást hydrogelů a fibrózních scaffoldů (Chen 2020). Syntetické materiály mají oproti přírodním silnější mechanické a lepší fyzikální vlastnosti, které lze snadněji kontrolovat. I díky těmto vlastnostem není variabilita jednotlivých šarží scaffoldů tak vysoká, jako tomu je například u přírodních materiálů. Mezi syntetické materiály pro výrobu scaffoldů patří například kyselina polymléčná (PLA), tzv. polylaktid, kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny polyglykolové (PLGA) nebo poly(ϵ -kaprolakton)

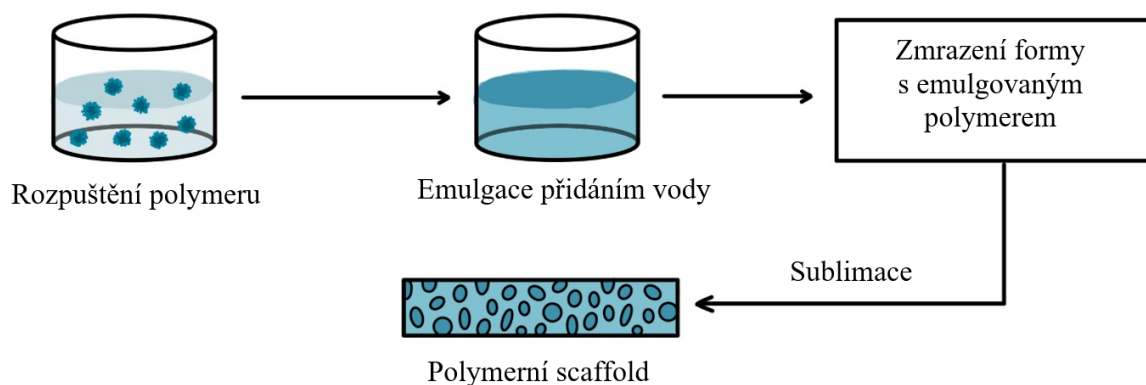
(PCL). Jedná se o lineární alifatické polyestery, které v nemodifikované formě nevykazují žádnou významnou toxicitu pro buňky kultivované na jejich povrchu a rozkládají se na netoxické monomery, jako je kyselina mléčná (Richbourg et al. 2019). Pro zlepšení biokompatibility, uchycení a růstu buněk lze povrch materiálu upravit pomocí laseru. Další metodou je nanosení povlaku z přírodní látky, kterou je nejběžněji kolagen, fibronectin a vitronektin (Huang et al. 2022). V porovnání s přírodními materiály jsou scaffoldy ze syntetických materiálů mnohem levnější a déle vydrží, takže je lze skladovat i po delší dobu (Alaribe et al. 2016). Spojením dvou či více různých polymerů vznikají kompozitní scaffoldy. Lze kombinovat jak přírodní s přírodními, syntetické se syntetickými, tak i přírodní se syntetickými materiály. Při výrobě kompozitních scaffoldů jsou polymery obvykle míchány v různých koncentračních poměrech, což umožňuje upravit fyzikálně-chemické vlastnosti scaffoldu dle požadovaných parametrů, jako jsou například teplota, pH, pórovitost, hustota zesíťování, příjem vody a průchod živin. Tak lze dosáhnout optimální kombinace biokompatibility, mechanické pevnosti, degradace a dalších vlastností scaffoldu (Badekila et al. 2021).

Výroba scaffoldů zahrnuje několik kroků a může se lišit v závislosti na materiálech a požadovaných vlastnostech. Prvním krokem při výrobě scaffoldů je vytvoření roztoku nebo suspenze, která je následně zpracována pomocí různých technik k vytvoření požadované struktury. Struktura scaffoldu může být porézní či vláknitá (Obrázek 8) nebo se může jednat i o hydrogel či mikronosič, kterým je věnována samostatná podkapitola. Mezi nejběžněji využívané metody pro výrobu scaffoldů se řadí odlévání rozpouštědlem a částicové louhování, lyofilizační sušení, elektrostatické zvlákňování, pění plynem a rychlé prototypování.



Obrázek 8: **Znázornění různých druhů nosičů:** a) porézní scaffold, b) fibrózní scaffold, c) hydrogel, d) sférický mikronosič - upraveno dle (Vishal 2016).

Metoda lyofilizačního sušení využívá sublimace, kdy je odstraněna kapalina, která za určitého tlaku a teploty nepodléhá procesu tání a přechází tak rovnou do páry. Po rozpuštění polymeru ve vhodném organické rozpouštědle a vodě je roztok ochlazen pod bod mrazu. Během následné lyofilizace jsou odstraněna rozpouštědla a látky přítomné v pevné fázi se oddělí, což vede ke vzniku porézních struktur (Obrázek 9). Tato metoda je užitečná pro rychlou přípravu vysoce porézních scaffoldů, jejichž póry dosahují velikosti přibližně 100 až 300 μm (Koyyada a Orsu 2021). Jejich velikost lze ovlivnit hodnotou pH a rychlostí zmrazování, kdy šokové zmrazování napomáhá formovat menší póry, než pomalé a postupné snižování teploty (Vishal 2016). Výhodou této metody je, že nevyužívá vysokých teplot, které by jinak mohly ovlivnit aktivitu integrovaných biologických faktorů. Zároveň lze takto připravit scaffoldy ze širokého spektra materiálů od přírodních až po syntetické látky a jejich kombinace. Nevýhody této metody zahrnují vysokou spotřebu energie, vznik nehomogenních velikostí pórů a použití cytotoxických rozpouštědel pro rozpuštění polymerů, jejichž nedostatečné odstranění v průběhu lyofilizace může způsobit úmrtí nasazených buněk (Koyyada a Orsu 2021).

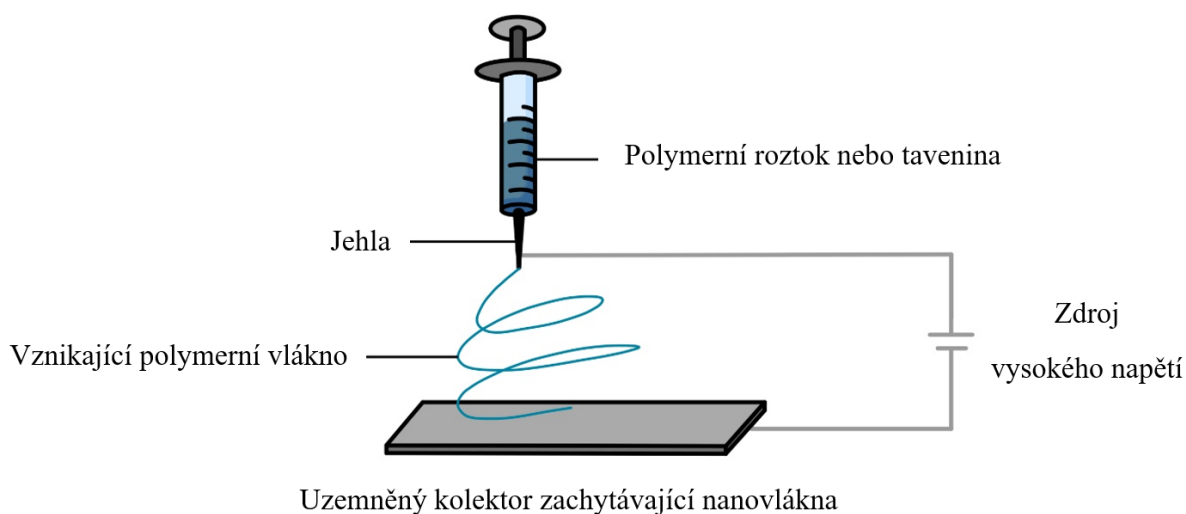


Obrázek 9: **Lyofilizační sušení** – upraveno dle (Koyyada a Orsu 2021).

Částicové louhování je nejběžnější a nejjednodušší technikou, kterou lze připravit scaffold ze syntetických materiálů. Výhodou této techniky je, že lze celkem jednoduše kontrolovat velikost připravovaných pórů a pórovitost. Principem této metody je smíchání polymeru a vody s rozpuštěnými částicemi, jako jsou například chlorid sodný nebo citrát sodný. Směs se slije do formy a následně se rozpouštědlo nechá odpařit nebo vysušit lyofilizací. Kolem krystalků vznikají póry, které je nutné promýt a krystalky soli následně odstranit, tak aby scaffold získal porézní strukturu. Odstranění těchto částic ze středu scaffoldu je poměrně náročné, takže je tato metoda vhodná pouze pro scaffoldy s tloušťkou do 2 mm.

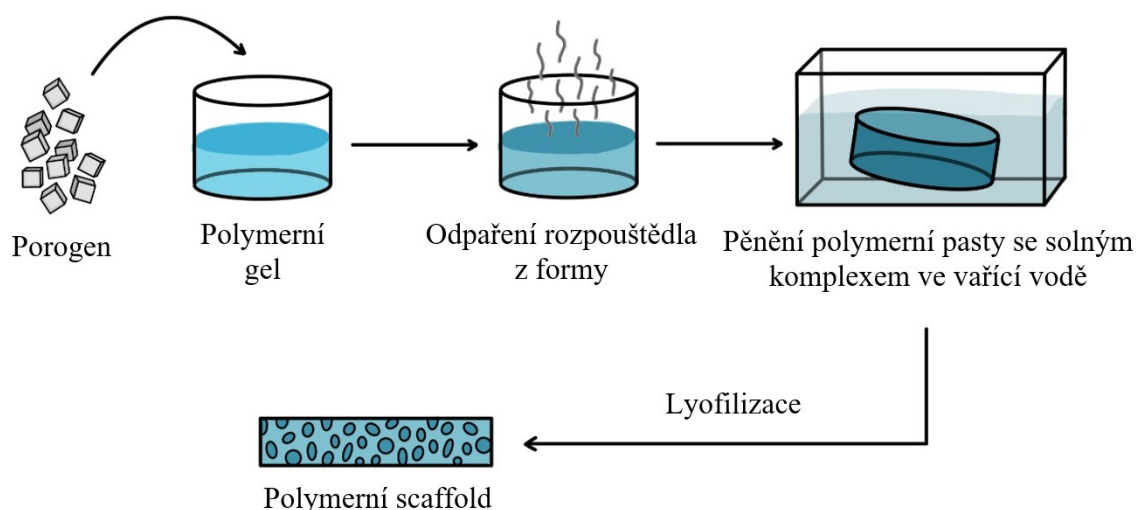
Výhodou této metody je poměrně jednoduché provedení a nenáročnost na použitý materiál (Vishal 2016). Lehce modifikovaným přístupem k odstranění částic je vyluhování částic pomocí taveniny, při kterém je polymer odléván do pevného porogenu. Působením vysokého tlaku a teploty vzniká uvnitř porózní struktura a porogen je následně vyluhován vodou. Pórovitost scaffoldů závisí na koncentraci porogenu, zatímco velikost pórů závisí na průměru porogenu (Koyyada a Orsu 2021).

Elektrostatické zvlákňování je šetrnou a všestrannou technikou přípravy fibrózního scaffoldu, která využívá elektrostatické síly pro výrobu velmi jemných polymerních vláken. K tvorbě vláken dochází mezi dvěma opačně nabitými elektrodami, z nichž jedna je v kontaktu s roztokem či taveninou polymeru, které tak předává část svého náboje (Obrázek 10). Přitažlivé elektrostatické síly opačné elektrody ovlivňují kapku polymeru, která byla vytvořena mechanickou silou pomocí stříkačky, a ta následně překonává povrchové napětí roztoku a iniciuje tak tvorbu vláken (Vishal 2016). Vlákna se shromažďují na kolektoru a v průběhu tohoto procesu se rozpouštědlo, obsažené ve vláknech, začne vlivem vzdušného prostředí odpařovat. Vzniká tak pevné polymerní vlákno v rozměrech od desítek nanometrů po mikrometry. Metoda elektrostatického zvlákňování je dvojího typu. Dle výsledného vektoru elektrického pole a polohy stříkačkové pumpy vůči úrovni země se dělí na horizontální a vertikální. Při horizontální metodě jsou stříkačka a výsledný vektor elektrického pole rovnoběžné s kolektorem, zatímco při vertikální metodě jsou stříkačka a výsledný vektor elektrického pole ke kolektoru kolmé. Faktory ovlivňující strukturu a velikost vzniklých vláken jsou koncentrace roztoku, molekulová hmotnost polymeru, viskozita, intenzita elektrického pole, rychlost přívodu roztoku a napětí. Proces umožňuje vytvoření scaffoldu z nepřehledného množství druhů polymerů, je neinvazivní a nevyžaduje použití koagulační chemie nebo vysoké teploty pro tvorbu vláken. Výhodou této metody je, že lze produkovat scaffoldy s kontrolou nad geometrií a velikostí pórů, což je klíčové pro buněčnou migraci. Zároveň tak lze vyrábět scaffoldy, které se v jednotlivých šaržích neliší (Koyyada a Orsu 2021).



Obrázek 10: **Vertikální sestava pro elektrostatické zvlákňování** – upraveno dle (Koyyada a Orsu 2021).

K vytvoření polymerního scaffoldu bez použití organických rozpouštědel lze využít pění plynem. Jakožto porogen se u této techniky nejběžněji využívá oxid uhličitý (CO_2), který vně směsi polymeru expanduje a utváří tak póry. Slabinou této metody je, že obecně vede ke vzniku neporézního povrchu scaffoldu a uzavřené struktury pórů, přičemž vzájemně propojených pórů je pouze 10-30 % (Vishal 2016). Dalším běžně využívaným porogenem je hydrogenuhličitan amonný (NH_4HCO_3), který se ve formě krystalků přimíchává do polymeru. Vytvoří se tak polymerní pasta, která je přenesena do formy a následně ponořena do horké vody (Obrázek 11). Reakcí s vodou dochází k vývinu plynného amoniaku (NH_3) a CO_2 . Částice NH_4HCO_3 se vyluhují, čímž vzniká ztuhlá polymerní matrice s póry o velikosti 30–700 μm a porozitou 85 až 93 %. Pro výrobu scaffoldů se tato metoda obvykle využívá v kombinaci s lyofilizací tak, aby byla zajištěna větší propojenost pórů (Koyyada a Orsu 2021).



Obrázek 11: **Pěnění plynem** – upraveno dle (Koyyada a Orsu 2021).

Metoda rychlého prototypování neboli *rapid prototyping* (RP) se používá k přímé výrobě scaffoldů z digitálních 3D dat pomocí počítačem podporovaného designu (CAD, *computer aided design*). Umožňuje přesnou výrobu scaffoldů s definovanou porozitou a velikostí pórů v rozmezí 50-300 μm . Základní princip této metody spočívá v tom, že je celkový scaffold vytvářen ve vrstvách. Nanášenou formou materiálu může být prášek nebo tekutina, která postupně zasychá a tvrdne. Existují různé techniky RP, které se liší dle typu použitého materiálu, mechanismu tvorby vrstev, rozlišení a přesnosti. Stereolitografie je založena na vytvrzení polotekutého polymeru, který je citlivý na světlo, pomocí UV laseru. Oproti tomu selektivní laserové sinterování zahrnuje použití paprsku laseru k vytvrzení práškového materiálu. Díky tomu vznikají velice pevné a tvrdé scaffoldy s velikostí pórů 45-200 μm . Tavené depoziční modelování je jedinou z technik, která využívá tepla a termoplasticity některých polymerů pro stavbu scaffoldu. Póry o velikosti 80-300 μm jsou vytvářeny pomocí pohyblivé trysky, kterou prochází pevný polymer a zde jeho zahříváním vzniká tavenina, která se postupně nanáší ve vrstvách a zpětně znovu ztvrdne. Poslední z hojně využívaných RP technik je 3D tisk, kdy je na povrch matrice nanášena vrstva prášku a pomocí inkoustové trysky se na ni po kapkách nanáší pojivo. Pojivo napomáhá spojovat sousední částice prášku a postupně tak vzniká scaffold s velikostí pórů od 45 do 500 μm . Výhodou této metody je poměrně snadné zpracování a vysoká pórovitost scaffoldu. Určitým omezením této metody je však nedostatečná mechanická pevnost vyrobeného scaffoldu oproti předešlým technikám a použití organických rozpouštědel v průběhu výroby (Koyyada a Orsu 2021).

4.2 Hydrogely

Hydrogely jsou sítě propojených polymerních řetězců nebo komplexních přírodních či syntetických proteinových molekul, které mohou absorbovat a zadržovat velké množství vody nebo biologických tekutin. Vysoký podíl vody je jednou ze základních charakteristik, která odlišuje hydrogely od scaffoldů, a zajišťuje jim jejich pružnou a měkkou strukturu. Mají hydrofilní charakter, ale díky jejich zesíťované struktuře jsou ve vodě nerozpustné. Zároveň jim tato vlastnost umožňuje absorbovat stejné množství vody, kolik váží jejich sušina (Hanasti et al. 2023). Jsou jedinečné díky své schopnosti napodobovat ECM a zároveň umožňují rozpustným faktorům, jako jsou cytokiny a růstové faktory, procházet tkání podobným gelem (Jensen a Teng 2020). Hydrogely používané v 3D buněčných kulturách vykazují několik důležitých mechanických vlastností, které ovlivňují chování buněk a výsledky experimentů. Mechanická pevnost lze přizpůsobit tak, aby odpovídala mechanickým vlastnostem požadovaných pro různé typy tkání. Obecně platí, že čím vyšší je koncentrace určitého typu hydrogelu nebo stupeň zesíťování, tím vyšší je jeho mechanická pevnost (Sun et al. 2021).

Obdobně jako scaffoldy se i hydrogely dělí dle původu a složení na přírodní, syntetické a hybridní. Mezi přírodní hydrogely patří materiály, jako je želatina, kolagen, agaróza a alginát, které jsou netoxické, snadno dostupné a relativně levné. Přírodní hydrogely navíc vykazují vynikající biokompatibilitu a biologickou odbouratelnost, což je vhodné pro aplikace v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně. Jednou z hlavních nevýhod v porovnání se syntetickými hydrogely je variabilita jejich struktury a vlastností, což může vést k nekonzistentním výsledkům experimentů. U syntetických materiálů jako je PNIPAAm, PEG a PLGA jsou mechanické a chemické vlastnosti mnohem lépe kontrolovatelné. Hybridní hydrogely kombinují přírodní i syntetické složky a využívají výhod obou, čímž zajišťují rovnováhu mezi biokompatibilitou a nastavitelnými fyzikálními vlastnostmi (Hanasti et al. 2023).

Matrigel je druhem komerčně vyráběného hydrogelu na bázi bílkovin, který se vyrábí z myších sarkomových buněk. Obsahuje mnoho základních složek ECM, jako je kolagen, laminin, entaktin, proteoglykan heparansulfát a důležité růstové faktory, které jsou nezbytné pro růst a vývoj buněk. Pro získání gelové struktury z granulovaného Matrigelu hraje zásadní roli teplota. Matrigel je materiál citlivý na teplotu, který při zvýšení teploty ze 4 °C na fyziologickou teplotu přibližně 37 °C přechází polymerizací z kapalného do gelového stavu (Mahdieh et al. 2022). Dalším běžně využívaným komerčním produktem je peptidový hydrogel

PuraMatrix, který je na rozdíl od Matrigelu čistě ze syntetických složek. Za teploty 37 °C a pH 7 se sám, díky iontové komplementaritě oligopeptidů s β -listem, sestavuje a vytváří vláknitou matici s velikostí vláken podobnou ECM. K dosažení optimálního růstu a diferenciaci buněk je ale nutné do tohoto hydrogelu doplnit vhodné bioaktivní molekuly. Tento hydrogel má obdobné mechanické vlastnosti jako mozková tkáň, takže se hojně využívá například pro kultivaci neuronů (Abbasi Aval et al. 2022).

4.3 Mikronosiče

V závislosti na potřebách kultivované buněčné linie mohou být buňky do bioreaktoru nasazeny samovolně nebo navázané na nosiči. V případě, kdy jsou buňky s nosiči nekompatibilní nebo by bylo obtížné s nimi pracovat, se od kultivace na mikronosičích upouští, avšak jejich použití je díky velké řadě benefitů častější. Mikronosič je malá podpurná matrice kulovitého tvaru, která umožňuje růst a kultivaci adherentních buněk. Místo na rovinném povrchu se buňky kultivují vně či na povrchu mikročástic, kdy na jedné mikročástici může být navázáno až několik set buněk. Docílí se tak kultivace velkého počtu buněk v menším objemu, což zefektivní kultivaci, sníží složitost procesu a nároky na pracovní sílu. Řada terapeuticky významných buněk je závislá na adhezi a mikročástice tak poskytují jednoduchý způsob, jak rozšířit kultivační systémy pro průmyslovou výrobu buněčných nebo proteinových terapií a obecně pro výzkumné účely (Licata et al. 2023).

Existuje celá řada typů mikronosičů, které se liší tvarem, materiálem a velikostí. Většinou se jedná o kulovité matrice s průměrem v rozmezí 100-300 μm , ale používají se například i vlákna, krychle či disky. Povaha povrchu a materiál, ze kterého jsou vyrobeny, jsou klíčovými faktory pro adhezi buněk k matici. Dalšími aspekty, na které má druh materiálu vliv jsou toxicita, permeabilita, hydrofilnost, mechanická stabilita a optické vlastnosti. Hustota je minimálně vyšší než hustota vody, takže mikročástice zůstávají ponořeny v suspenzi v kultivační nádobě. V minulosti se používaly syntetické materiály, jako je například akrylamid, polystyren, sklo nebo diethylaminoethyl dextran hydrochlorid (DEAE-dextran). Tyto materiály umožňovaly snadnou kontrolu mechanických vlastností a reprodukovatelné výsledky pro hodnocení jejich účinnosti. Vývoj v oblasti mikronosičů vedl k začleňování přírodních polymerů z důvodu jejich biokompatibility a faktu, že tyto buňkám bližší látky poskytují prostředí podporující správnou diferenciaci a věrohodněji napodobují prostředí *in vivo*. Mezi nejčastěji používané přírodní polymery se řadí sacharidy (škrob a chitosan), proteiny (gelatin a kolagen) a chemicky modifikované sacharidy (polyakrylový škrob). Povrch částic bývá kvůli umožnění adheze upraven a může obsahovat kladně či záporně nabitě funkční

skupiny, peptidy nebo proteiny ECM (Kulchar et al. 2021). Další důležitou vlastností mikronosičů je jejich porozita. Existují mikronosiče hladké (mikroporézní) nebo porézní (makroporézní), kdy u porézních mikronosičů mohou kultivované buňky růst i uvnitř, a nejen na jejich povrchu. Tímto jsou buňky chráněny před třecími silami, mechanickým poškozením a zároveň mají buňky pro růst mnohem větší povrch a kultivace tak dosahují vyšších buněčných denzit. Komerčními příklady mikronosičů jsou CultiSpher na bázi želatiny, Cytodex 3 na bázi kolagenu, Cytopore a DE53 na bázi celulózy (Chen et al. 2011).

4.4 Bioreaktory

Bioreaktory jsou klíčová zařízení v oblasti biotechnologie a tkáňového inženýrství, která slouží k regulaci růstu a diferenciaci buněk v kontrolovaném dynamickém prostředí. Jsou nezbytné pro poskytování standardizovaných a reprodukovatelných buněčných produktů pro aplikace v regenerativní medicíně nebo pro vytváření fyziologicky relevantních modelů *in vitro* pro testování farmakologických látek. V závislosti na zamýšleném použití a specifických požadavcích různých typů buněk existuje mnoho rozdílných variant bioreaktorů, které se pokouší co nejvěrněji napodobit *in vivo* podmínky původní tkáně (Stephenson a Grayson 2018). Obecně se bioreaktory skládají z míchacího zařízení, přívodu a odvodu média, ventilu pro přívod vzduchu, ventilu na odběr vzorků, teploměru a tlakoměru.

Buňky mohou být do bioreaktorů nasazeny jako volně suspenzní, ale mnohem častěji se využívá mikronosičů nebo scaffoldů, na kterých jsou buňky navázány. Mikronosičům a jejich použití je věnována samostatná podkapitola. Pokud jsou samostatné buňky nebo mikronosiče rozptýleny v kultivačním médiu, kde se volně pohybují, jedná se o submerzní neboli suspenzní bioreaktor. Příkladem takového typu jsou *rotating wall vessel*, *stirred tank* a *wave motion* bioreaktory. Naproti tomu opakem jsou perfuzní bioreaktory, jako je například *packed bed* a *hollow fiber* bioreaktor, ve kterých jsou buňky imobilizovány ve scaffoldech a nemohou se tedy volně pohybovat v médiu. Obecným principem většiny bioreaktorů je udržení buněčné suspenze nebo kultivačního média v nepřetržitém pohybu, tak aby bylo zajištěno rovnoměrné rozprostření živin a tepla. To je zajištěno kontinuálním mícháním, rotací nádoby nebo průtokem média (Kuystermans a Al-Rubeai 2011).

Bioreaktor může pracovat v několika režimech: batch, fed-batch, kontinuálním a perfuzním. Pokud jde o dostupnost živin, nejběžnější strategií pro dodávání kultivačního média do procesu je systém fed-batch. Fed-batch je provozní režim, kdy se do bioreaktoru během kultivace dodává jedna nebo více živin, ale produkty zůstávají v bioreaktoru až do konce kultivace. Při batch režimu se všechny živiny přidávají pouze na začátku produkčního cyklu.

Jediným kontinuálním přídatkem je přívod plynu, který probíhá difuzí přes rozhraní média. Perfuzní režim je založen na kontinuálním průtoku média bioreaktorem, kde jsou buňky imobilizovány v pevném nosiči, a je tak udržována konstantní koncentrace živin a veškeré odpadní látky jsou odstraněny. Kontinuální režim funguje na obdobném principu jako perfuzní s tím rozdílem, že objem média v bioreaktoru, kde jsou buňky suspenzí, zůstává konstantní. Dochází tedy ke kontinuálnímu přítoku čerstvého a odtoku použitého média. Nevýhodou fed-batch, perfuzního a konstantního režimu oproti batch režimu je vyšší riziko kontaminace (Kuystermans a Al-Rubeai 2011).

Jednou z hlavních úloh bioreaktoru je řízení a kontrola biologických podmínek, jako je tenze O_2 a CO_2 , pH, teplota, osmolarita, koncentrace živin, růstových faktorů, odvod odpadních produktů a rychlost průtoku média. Mikroprostředí je ovlivňováno dynamikou tekutin, které brání akumulaci vylučovaných produktů či toxinů, zároveň zde ale vzniká smykové napětí, které může vyvolat žádoucí i nežádoucí formy diferenciací buněk (Rodrigues et al. 2011).

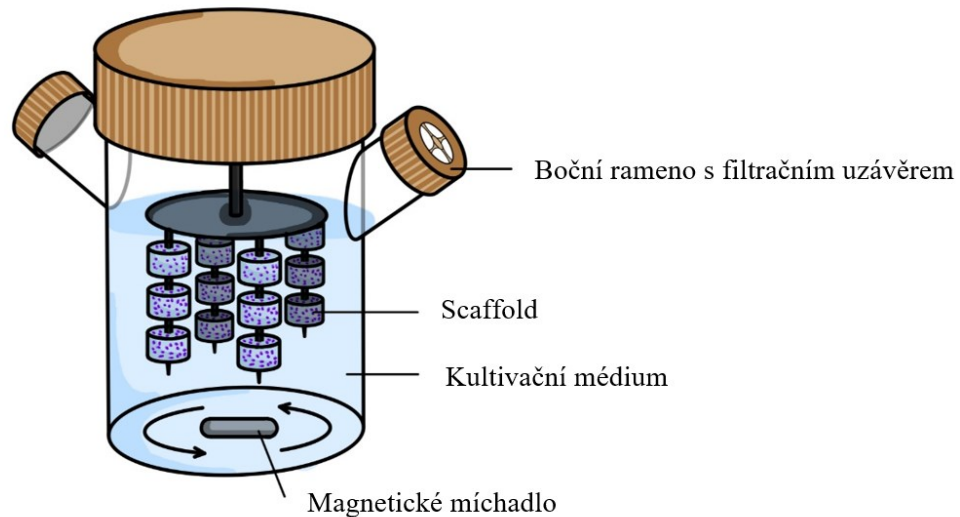
Mezi hlavní výhody bioreaktorů náleží možnost dlouhodobé kultivace buněk ve velkém množství a poměrně jednoduchá kultivace z buněčné suspenze. Kompaktnost a životaschopnost sféroidů vzniklých v submerzním systému je srovnatelná se sféroidy získanými metodou visící kapky a jsou odolnější než sféroidy získané kultivací na nepřilnavých površích (Raghavan et al. 2016). V průběhu kultivace ale nelze ovlivnit velikost jednotlivých sféroidů, takže vzniká jejich heterogenní směs. Pro jejich studium je tedy nezbytný přesun do jiného kultivačního prostředí (Hoarau-Véchet et al. 2018). Další nevýhodou je vysoká pořizovací cena bioreaktorů a nároky na speciální vybavení.

Bioreaktory mohou být rozděleny na jednorázové a víceúčelové, které jsou navrženy pro opakované použití a často jsou vyrobeny z nerezové oceli nebo skla. Naopak jednorázové bioreaktory jsou určeny pro jedno použití a jsou obvykle vyrobeny z flexibilních plastových materiálů. Díky ulehčení procesu čištění, sterilizace, nízké počáteční investici, snadné manipulaci a nižším provozním nákladům představují jednorázové bioreaktory nový trend. Pevnost plastových materiálů u těchto systémů ale znemožňuje kultivaci velkých objemů suspenze a zároveň s jejich použitím vzniká velké množství biologicky nerozložitelného plastového odpadu. Jedná se jak o statické i dynamické systémy, kterými je například bioreaktor s vlnovým pohybem, bioreaktor s rotující stěnou nebo „*hollow fibre*“ bioreaktor. Mezi víceúčelové bioreaktory se řadí například ty s mechanickým mícháním. Objem opakovaně použitelných bioreaktorů je obvykle větší než u jednorázových a pro výrobu

biologických látek ze savčích buněk v komerčním měřítku může dosahovat až 25 m³ (Sharma et al. 2022).

Bioreaktory s mechanickým mícháním, tzv. "*stirred tanks*", představují jeden z nejpoužívanějších typů pro kultivaci buněk. Původně se využívaly především pro kultivaci bakterií, dnes se hojně využívají pro produkci biofarmaceutik, jako jsou protilátky, hormony a vakcíny. Jedná se o válcovou nádobu s míchadlem poháněným motorem na centrální hřídeli. Míchadlo zajišťuje homogenizaci roztoku, udržuje buňky v suspenzi a distribuuje kyslík, živiny a teplo v celém objemu kultivačního média. V závislosti na typu buněk a náchylnosti k jejich poškození lze použít různé typy míchadel. Například Rushtonovy turbíny jsou vhodné pro odolnější typy buněk, jako jsou bakterie, zatímco živočišné buňky, které jsou citlivější na působení tření, vyžadují jemnější mechanismy míchání. Příkladem takových míchadel jsou mořská nebo lopatková oběžná kola (*marine or pitched blade*) (Sharma et al. 2022). Klíčovým faktorem je také rychlost míchání v průběhu kultivace, protože příliš vysoká rychlost může způsobit poškození buněk a nízká rychlost nezamezí sedimentaci a adhezi buněk ke dnu nádoby (Ryu et al. 2019). Tento typ bioreaktoru se vyskytuje v široké škále velikostí, od malých laboratorních modelů s objemem v řádu litrů až po velké komerční bioreaktory s maximální kapacitou 2000 litrů. Menší bioreaktory do 100 litrů se obvykle používají pro výzkum a vývoj a bývají vyrobeny z plastu pro jednorázové použití. Naproti tomu velkoobjemové bioreaktory, určené pro komerční produkci biofarmaceutik, se vyrábějí z nerezové oceli a jsou konstruovány pro opakované použití (Bellani et al. 2020).

Třepací baňky neboli "*spinner flasks*" jsou založeny na obdobném principu jako "*stirred tanks*" a řadí se mezi bioreaktory s mechanickým mícháním, které je zajištěno pomocí magnetického míchadla nebo hřídelí. Na rozdíl od předchozího typu bioreaktoru jsou buňky uchyceny ve scaffoldech, které jsou pomocí jehel připevněny k vrchní straně nádoby a ponořeny do kultivačního média (Obrázek 12). Tento typ bioreaktoru se využívá převážně v tkáňovém inženýrství pro tvorbu kostní tkáně (Ghosh a Srivastava 2022).



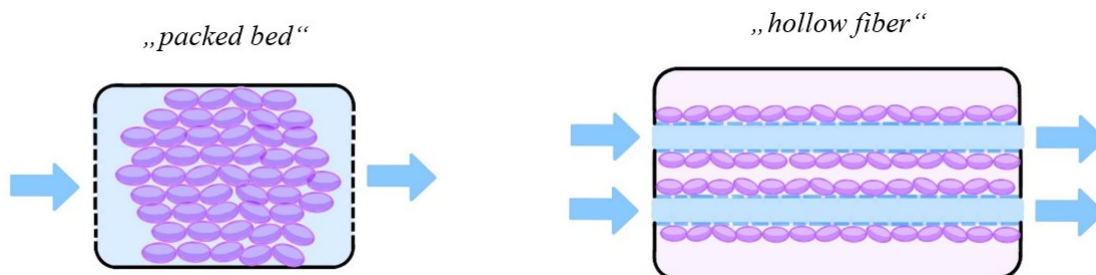
Obrázek 12: Schéma třepací baňky – upraveno dle (Ghosh a Srivastava 2022).

Bioreaktor s vlnovým pohybem, tzv. „*wave motion*“ nebo také „*rocking bed bioreactor*“, využívá ke kultivaci obdélníkový vak, který je částečně naplněn růstovým médiem se suspenzí buněk s mikronosiči a plynnou směsí. Platforma se s připevněným vakem kývavě pohybuje v optimalizované rychlosti a úhlu, čímž ve vaku generuje vlny. Tyto vlny zajišťují dostatečné promíchání a okysličení kultivačního média. Díky šetrnému míchání a nízkému smykovému napětí je bioreaktor s vlnovým pohybem ideální pro kultivaci citlivých buněk, které by jinak mohly být poškozeny mechanickým mícháním v jiných typech bioreaktorů (Sharma et al. 2022).

Dalším běžně využívaným druhem bioreaktoru je bioreaktor s rotující stěnou, tzv. „*rotating wall vessel*“ (RWV), který byl vyvinut společností Synthecon pro Národní úřad pro letectví a vesmír (NASA) pro ochranu experimentálních buněčných kultur před silami v průběhu vzletu a přistání kosmického raketoplánu. Skládá se z horizontální rotující nádoby zcela naplněné kultivačním médiem a centrální hřídele pokryté mikroporézními silikonovými trubičkami pro difúzní výměnu rozpuštěných plynů. Tento bioreaktor nevyužívá míchadlo, ale pohyb média je zajištěn pouze rotací nádoby kolem jedné osy. Rotuje specifickou rychlostí, která udržuje rovnováhu mezi gravitační a hydrodynamickou silou působící na buňky, čímž vzniká simulované mikrogravitační prostředí. Buňky navázané na mikronosičích se nachází v neutrálním vztlaku a volně se vznášejí v prostoru média (Gardner a Herbst-Kralovetz 2016). Z počátku se nádoba otáčí nízkou rychlostí, ale s postupně rostoucími buněčnými agregáty je nutné rychlost otáčení zvyšovat (Gupta et al. 2016). Jednou z modifikací RWV bioreaktoru je dvouosý rotační bioreaktor, který rotuje ve dvou na sebe kolmých osách

a využívá kulovitou kultivační nádobu. Buňky se nepohybují volně, ale jsou připevněné ve scaffoldech na koncích jehel, které jsou upevněny ve stěně nádoby (Varley et al. 2017).

„*Packed bed*“ a „*hollow fiber*“ jsou dva typy bioreaktorů, které řadíme mezi perfuzní systémy, určené pro kontinuální kultivaci buněčných kultur. Jejich společným znakem je nepřetržitý průtok kultivačního média skrz nádobu, ve které jsou uloženy buňky. Tímto způsobem jsou průběžně dodávány živiny a odstraňovány odpadní látky, takže je vytvářeno prostředí s optimálními podmínkami pro růst vysoké koncentrace buněk. Způsob, jakým jsou buňky v kultivační nádobě ukotveny, je ale rozdílný (Tregidgo et al. 2023). U „*packed bed*“ bioreaktorů jsou buňky imobilizovány na povrchu pevných částic nebo nosičů, které tvoří lůžko uvnitř nádoby bioreaktoru. Médium, které proudí bioreaktorem, prochází přímo skrz toto lůžko a kultivované buňky (Obrázek 13). „*Hollow fiber*“ bioreaktory neboli bioreaktory s dutými vlákny, mají v porovnání s ostatními bioreaktory jeden z nejkompexnějších designů. Jsou sestaveny z velkého množství dutých mikroporézních vláken, která jsou uspořádána paralelně uvnitř nádoby bioreaktoru. Skrze tyto vlákna proudí médium, které přivádí živiny a kyslík buňkám přichyceným na vnější straně (Ehrlich et al. 2019).



Obrázek 13: Proudění média u perfuzních bioreaktorů – upraveno dle (Ehrlich et al. 2019).

4.5 Biotisk

3D tisk je výrobní proces, který vytváří trojrozměrné objekty vrstvením materiálů na základě digitálních modelů. Umožňuje přesnou výrobu složitých struktur, takže je užitečný v různých oborech. Například lze pomocí 3D tisku vytvářet scaffoldy a různé podpůrné matrice pro buňky. Biotisk je specializovaná forma 3D tisku, která již pracuje s bioinkoustem s buněčnou náplní za účelem výroby živých struktur *in vitro* (Merotto et al. 2023). Podle principu fungování lze technologii 3D biotisku rozdělit do tří podtypů na inkoustový tisk, laserový tisk a tisk na bázi pneumatické mikroextruze (Obrázek 14) (Park et al. 2021).

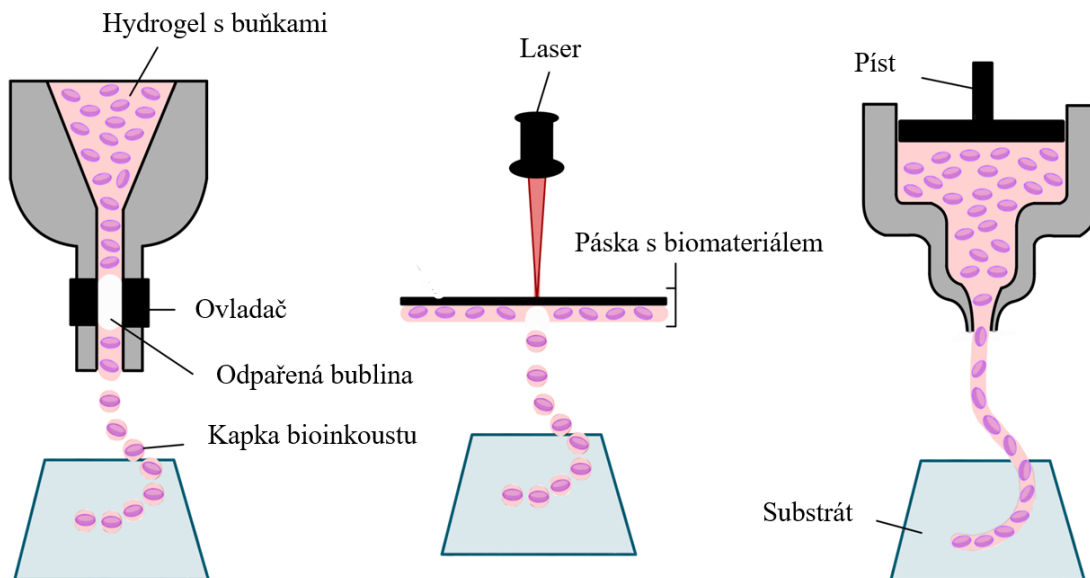
Proces inkoustového biotisku začíná přípravou bioinkoustu, který se obvykle skládá z buněk suspendovaných v hydrogelu, a jeho vložením do tiskové hlavy. Tisková hlava pomocí tepelných či piezoelektrických mechanismů kontrolovaně vystřikuje drobné kapičky

bioinkoustu na podklad. Při tepelném inkoustovém biotisku se využívá teplo k vytvoření bubliny, která vytlačí bioinkoust z trysky. Při piezoelektrickém inkoustovém biotisku způsobí elektrický náboj změnu tvaru piezoelektrického krystalu, čímž vznikne tlak, který vytlačí bioinkoust (Merotto et al. 2023). Jednou z hlavních výhod inkoustového biotisku je jeho vysoké rozlišení a přesnost, které umožňují vytvářet složité tkáňové struktury. Tato přesnost je klíčová pro replikaci složitějšího mikroprostředí, které se nachází v přirozených tkáních (Park et al. 2021). Zároveň je možné náplně s bioinkoustem v tiskové hlavě střídát, a tak vytvářet heterogenní tkáně z různých typů buněk a materiálů (Merotto et al. 2023). Ve srovnání s jinými technikami je inkoustový biotisk relativně rychlý a náklady na provoz nejsou tak vysoké, což jej činí více dostupným pro různé výzkumné a klinické aplikace. Bezkontaktní povaha procesu také snižuje riziko kontaminace, což je nezbytné pro zachování životaschopnosti a funkčnosti tištěných buněk. Nevýhodou inkoustového biotisku je ucpávání trysek, které narušuje proces tisku a negativně ovlivňuje výsledný produkt. Použité bioinkousty nesmí být vysoce viskózní, což omezuje škálu použitelných biomateriálů (Park et al. 2021).

System pro laserový biotisk se skládá ze tří důležitých prvků. Jakožto zdroj energie k uložení biomateriálu na substrát se využívá laser, který má dle typu substrátu přesně nastavené parametry vlnové délky a energie pulzu. Další důležitou částí je páska, která je přímo v kontaktu s bioinkoustem a absorbuje energii laseru. Část pásky se po absorpci záření odpaří a vytvoří vysokotlakou bublinu na rozhraní s vrstvou biomateriálu. Malá kapka tohoto materiálu je následně vytlačena a nanese na substrát. Substrát je třetí podstatnou složkou, která slouží jako podkladová vrstva pro tvorbu 3D struktury. Mezi materiály, které se běžně používají patří skleněná sklička, polymerní fólie a hydrogely (Park et al. 2021). V porovnání s inkoustovými tiskárnami u laserového biotisku nedochází ke kontaktu mezi bioinkoustem a dávkovačem. Buňky nejsou vystaveny mechanickému stresu a riziko kontaminace je nižší, což zlepšuje životaschopnost buněk a celkovou kvalitu tištěných tkání. Omezením u této metody je ale druh použitého hydrogelu v bioinkoustu, ten musí splňovat specifické optické vlastnosti, které zajistí účinnou absorpci laseru (Merotto et al. 2023).

Biotisk na principu pneumatické extruze spočívá v použití stlačeného vzduchu k pohonu bioinkoustu tryskou, což umožňuje řízené nanášení materiálů s buňkami. Bioinkoust je u tohoto systému nanášen kontinuálně, a ne ve formě kapek, jako tomu bylo u předešlých systémů. Stlačený vzduch je přiváděn do kazety naplněné bioinkoustem, čímž vytváří tlak a protlačuje bioinkoust tryskou ven. Velikost aplikovaného tlaku lze přesně řídit, což umožňuje regulovat rychlost průtoku bioinkoustu. Jednou z významných výhod pneumatické extruze je všestrannost. Může zpracovávat širokou škálu bioinkoustů, od nízkoviskózních roztoků

až po pasty s vysokou viskozitou, které obsahují vysoké koncentrace buněk. S pneumatickým vytlačováním jsou však spojeny i problémy. V průběhu vytlačování na buňky působí různé mechanické stresory, které mohou negativně ovlivnit jejich životaschopnost a funkci (Park et al. 2021).



Obrázek 14: Schéma systémů pro 3D biotisk – upraveno dle (Park et al. 2021).

4.6 Orgány na čipu

Termín „organ na čipu“ označuje biotechnologii, která v současné době představuje jeden z nejslibnějších a nejzajímavějších vývojových trendů v souvislosti s možností propojení biologie a inženýrství (Cacciamali et al. 2022). Jedná se o mikrofluidní zařízení určené pro kultivaci buněk, které napodobuje funkci, mechaniku a fyziologickou reakci konkrétních orgánů a orgánových systémů. Tato zařízení mohou být vyrobená z elastomerů, skla nebo plastů. Celkově je pro úspěšné vytvoření funkčních a realistických orgánů na čipu nezbytná kombinace vhodných typů buněk, biomateriálů a mikroinženýrských technologií (Yokoi et al. 2023).

Orgány na čipech využívají různé buňky k replikaci funkcí lidských tkání a orgánů. Mohou jimi být primární buňky, které jsou přímo izolovány z lidských tkání, nebo kmenové buňky, které mají schopnost diferenciaci v různé typy buněk. Kromě toho se často používají indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) díky své schopnosti diferencovat se v jakýkoli buněčný typ, což poskytuje univerzální nástroj pro vytváření různých tkáňových modelů. Výběr buněk závisí na konkrétním modelovaném orgánu či tkáni a na zamýšleném použití (Leung et al. 2022). Na čipech lze kultivovat jak sféroidy, tak i organoidy, které mohou

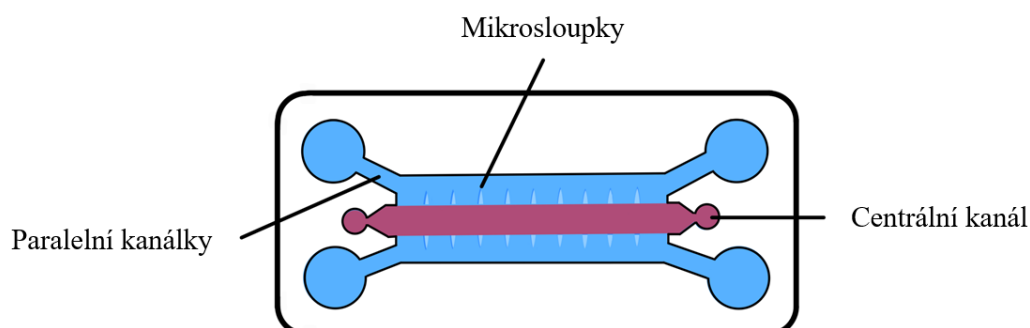
být předem vytvořené v jiném kultivačním systému nebo se tvoří sami spontánně až po nasazení jednotlivých buněk na čip (Fang et al. 2023).

Dalším zásadním aspektem při tvorbě orgánu na čipu je výběr biomateriálů. Biomateriály utváří prostředí podobné ECM, které je esenciální pro správnou interakci buněk a pro vytvoření fyziologicky relevantních podmínek při kultivaci. K replikaci prostředí *in vivo* se používají přírodní i syntetické biomateriály, které zajišťují, že se buňky chovají podobně jako v lidském těle (Cho et al. 2023).

Při vývoji a fungování orgánu na čipu hrají zásadní roli také mikrofluidní technologie. Tyto umožňují přesné řízení toku malých objemů tekutin prostřednictvím kanálků o rozměrech obvykle v řádu mikrometrů, což je nezbytné pro napodobení dynamického prostředí lidských tkání (Cho et al. 2023). K vytváření mikrofluidních kanálků se často používají techniky fotolitografie, měkké litografie nebo 3D tisku. Kromě toho byly vyvinuty různé peristaltické, stříkačkové či piezoelektrické mikropumpy, elektromagnetická čerpadla a gravitační průtokové systémy, které v těchto zařízeních usnadňují a umožňují perfuzi média (Yokoi et al. 2023). V technologii orgánu na čipu má zásadní význam pro přesnou replikaci fyziologických podmínek lidských tkání i dynamické mikroprostředí. Tento pojem označuje neustále se měnící podmínky v biologickém systému, které ovlivňují chování a funkci buněk. Tyto systémy umožňují přesnou kontrolu různých biochemických parametrů, jako je pH, hladina kyslíku a distribuce živin, které jsou nezbytné pro zachování funkce tkání. Mikrofluidní zařízení mohou simulovat i různé fyzikální podněty, jako je smykové napětí, elektrické stimuly a opakující se mechanické deformace. Například modely plic na čipu napodobují dýchací pohyby a modely srdce na čipu replikují stahy srdeční svaloviny. Do systému orgánu na čipu mohou být navíc integrovány biosenzory pro sledování biologických reakcí v reálném čase, což zvyšuje jejich využitelnost pro screening léčiv a modelování nemocí. Schopnost řízeně manipulovat s dynamickými podmínkami v systému činí z orgánů na čipu mocný nástroj pro biomedicínský výzkum (Fang et al. 2023).

Způsobů, jak sestavit orgán na čipu je mnoho, ale obecně existují dvě hlavní varianty mikroarchitektury. Ta jednodušší spočívá v tom, že je vytvořena struktura miniaturních cévních sítí, která je složena z několika paralelních kanálů propojených mikrosloupky (Obrázek 15). Tento model slouží pro studium interakcí mezi buňkami ve tkáni a s médiem. Tyto platformy jsou navrženy tak, aby napodobovaly specifické tkáňové struktury, jako jsou například anizotropní vrstvy srdečního svalu nebo šestiúhelníkový tvar jaterních lalůček, a umožňovaly tak studium funkcí specifických pro danou tkáň. Druhá mikroarchitektura zahrnuje bariéru, která je nezbytná pro napodobení fyziologických bariér vyskytujících se v lidských orgánech,

jako je například hematoencefalická bariéra nebo střevní bariéra. Tato zařízení se obvykle skládají ze dvou vrstev mikrofluidních kanálků, které jsou odděleny porézní membránou. Skrze tuto membránu prochází médium a umožňuje nám tak zkoumání mechanismů transportu materiálu přes bariéru (Cho et al. 2023).



Obrázek 15: **Mikroarchitektura orgánu na čipu** – upraveno dle (Cho et al. 2023).

Systémy s jedním orgánem na čipu dosahují vysokého stupně biologické autenticity, a umožňují vyhodnotit reakci konkrétního orgánu na chemický, biologický či fyzikální podnět. Existují ale i multiorgánové systémy, které poskytují prostředí pro zkoumání potenciální interakce jednoho orgánu s alespoň jedním dalším. Tato interakce je zprostředkována především prostřednictvím výměny metabolitů nebo rozpustných signálních molekul. Jak monoorgánové, tak multiorgánové systémy se často označují jako mikrofyziologické systémy, protože jsou určeny k modelování vlastností biologie člověka nebo zvířete v rámci kultury v mikroměřítku. Multiorgánové systémy, které modelují fyziologickou systémovou odezvu v těle, se běžně označují jako „body on a chip“. Volba monoorgánového nebo multiorgánového systému závisí na požadovaných funkcích potřebných k tomu, aby byl systém dobrým modelem fyziologických procesů. Stupeň složitosti by měl být udržován na minimu potřebném k reprezentaci biologické aplikace bez zavádění zbytečných faktorů, které by ztěžovaly používání a analýzu systému. Multiorgánové systémy obvykle vyžadují složitější technický návrh než monoorgánové systémy. Monoorgánové systémy jsou biologicky podrobnějšími modely orgánu, zatímco multiorgánové systémy používají méně podrobné modely orgánů a zaměřují se více na systémové interakce mezi orgány (Leung et al. 2022).

Pokračující vývoj v oblasti tkáňového inženýrství, biomateriálů, mikrofluidních technologií a výzkumu kmenových buněk dále posouvá možnosti a aplikace orgánů na čipu, což v budoucnosti otevře cestu k průlomovým objevům v personalizované medicíně a vývoji léčebných postupů. Jedním z cílů mikrofluidní technologie je vytvoření "člověka na čipu"

se složitější strukturou a rozmanitější funkcí, která by odrážela fyziologii celého lidského těla (Wu et al. 2023).

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce je seznámit čtenáře s různými metodami 3D kultivace a jejich základním principem. V oblasti 3D kultivace buněk se neustále objevují nové trendy a pokroky, které významně posouvají hranice biomedicínského výzkumu a klinické praxe.

Jedním z nejprogresivnějších trendů ve 3D kultivacích je biotisk. Tato technologie umožňuje vytváření složitých tkáňových struktur vrstvu po vrstvě pomocí bioinkoustu složeného z polymerních materiálů a buněk. Biotisk umožňuje tvorbu různých typů tkání, včetně kůže, cév, chrupavky, a dokonce i celých orgánů. Výhody biotisku zahrnují možnost vytváření personalizovaných tkání pro jednotlivé pacienty, což představuje velký příslib pro regenerativní medicínu a transplantace orgánů.

Dalším významným trendem jsou organoidy a orgány na čipu. Organoidy jsou miniaturní, trojrozměrné modely orgánů, které se vytvářejí z kmenových buněk a napodobují funkce i architekturu skutečných orgánů. Orgány na čipu, nebo také mikrofluidní čipy, jsou zařízení, která napodobují fyziologické prostředí orgánů a tkání na mikroskopické úrovni. Tyto inovativní modely umožňují detailní studium mezibuněčných interakcí, testování léčiv a screening chemických látek. Buňky kultivované v monovrstvách se běžně používají jako výchozí modelové systémy pro hodnocení účinnosti a bezpečnosti látek s terapeutickým potenciálem. Zatímco tento počáteční screening předchází preklinickým studiím na zvířatech před přechodem ke klinickým zkouškám na lidech, kultivované buňky často rozhodují o počátečních, avšak zásadních rozhodnutích, zda pokračovat ve vývoji léčiva. 3D kultury poskytují oproti monovrstvám buněk přesnější a relevantnější platformy pro testování, což vede ke snížení počtu neúspěšných klinických studií a lepší predikci účinků léčiv. Tímto 3D kultivace také výrazně přispívá k realizaci konceptu 3R („*replacement*“, „*reduction*“, „*refinement*“), který byl zaveden s cílem podpořit etičtější využívání zvířat ve výzkumu. „*Replacement*“ je nahrazení zvířecích modelů sofistikovanými *in vitro* systémy. 3D buněčné kultury umožňují vytvářet realistické modely lidských tkání a orgánů, které lépe napodobují fyziologické podmínky než tradiční 2D kultury. Zároveň tyto modely umožňují detailnější studium buněčných interakcí, což vede k redukci („*reduction*“) počtu zvířat potřebných v preklinických studiích. „*Refinement*“ se zaměřuje na zlepšení podmínek pro zvířata používaná v experimentálním výzkumu. 3D kultury umožňují provádět experimenty, které by jinak vyžadovaly invazivní zákroky na zvířatech, v méně invazivním prostředí *in vitro*. To vede k celkovému zlepšení etických podmínek vědeckého výzkumu. Pro široké přijetí technologií 3D buněčných kultur například v procesu objevování léčiv je stále ještě mnoho

výzev. Složitá morfologie a různorodost velikostí 3D modelů, jako jsou organoidy, vede k problémům při systematickém hodnocení a standardizaci protokolů pro testování. Zobrazovací metody a analýza nejsou prozatím v porovnání se zavedenými 2D metodami tak rozvinuty. I přesto mají 3D buněčné kultury v oblasti objevování a vývoje léčiv veliký potenciál, jehož budoucnost závisí na spolupráci různých vědních oborů, jako je biologie, medicína, fyzika a bioinformatika.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ABBASI AVAL, N., EMADI, R., VALIANI, A. a kol., **2022**. An aligned fibrous and thermosensitive hyaluronic acid-puramatrix interpenetrating polymer network hydrogel with mechanical properties adjusted for neural tissue. *Journal of Materials Science*. 57(4), 2883–2896. ISSN 1573-4803. DOI:10.1007/s10853-021-06733-0.
2. DIL, M. S., NARAYANAN, S. P. a SOMANATH, P. R., **2021**. Cell-cell junctions: structure and regulation in physiology and pathology. *Tissue Barriers*. 9(1), 1848212. ISSN 2168-8370. DOI:10.1080/21688370.2020.1848212.
3. ALARIBE, F. N., MANOTO, S. L. a MOTAUNG, S. C. K. M., **2016**. Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Biologia*. 71(4), 353–366. ISSN 0006-3088, 1336-9563. DOI:10.1515/biolog-2016-0056.
4. ALBERTS, B., ed., **2002**. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-3218-3.
5. ALCORTA-SEVILLANO, N., MACÍAS, I., INFANTE, A. a kol., **2020**. Deciphering the Relevance of Bone ECM Signaling. *Cells*. 9(12), 2630. ISSN 2073-4409. DOI:10.3390/cells9122630.
6. ANTONELLI, F., **2023**. 3D Cell Models in Radiobiology: Improving the Predictive Value of In Vitro Research. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(13), 10620. ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms241310620.
7. BADEKILA, A. K., KINI, S. a JAISWAL, A. K., **2021**. Fabrication techniques of biomimetic scaffolds in three-dimensional cell culture: A review. *Journal of Cellular Physiology*. 236(2), 741–762. ISSN 1097-4652. DOI:10.1002/jcp.29935
8. BASU, S., BALLAV, A. J., DESHMUKH, S. a kol., **2021**. Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Culture and Their Applications. In: *Cell Culture - Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences*. B.m.: IntechOpen. ISBN 978-1-83969-446-2. DOI: 10.5772/intechopen.100382.
9. BELLANI, C. F., AJEIAN, J., DUFFY, L. a kol., **2020**. Scale-Up Technologies for the Manufacture of Adherent Cells. *Frontiers in Nutrition*. ISSN 2296-861X. DOI:10.3389/fnut.2020.575146.
10. BRESLIN, S. a O'DRISCOLL, L., **2013**. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 18(5–6), 240–249. ISSN 13596446. DOI:10.1016/j.drudis.2012.10.003.
11. BRÜCHER, B. L. D. M. a JAMALL, I. S., **2014**. Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment, Carcinogenesis, and Anticancer Treatment. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 34(2), 213–243. ISSN 1015-8987. DOI:10.1159/000362978.

12. CACCIAMALI, A., VILLA, R., DOTTI, S. a kol., **2022**. 3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications. *Frontiers in Physiology*. ISSN 1664-042X. DOI:10.3389/fphys.2022.836480.
13. CALIARI, S. R. a BURDICK, J. A., **2016**. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*. 13(5), 405–414. ISSN 1548-7105. DOI:10.1038/nmeth.3839.
14. DUVAL, K., GROVER, H., HAN, L.-H. a kol., **2017**. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*. 32(4), 266–277. ISSN 1548-9213. DOI:10.1152/physiol.00036.2016.
15. EHRLICH, A., DUCHE, D., OUEDRAOGO, G. a kol., **2019**. Challenges and Opportunities in the Design of Liver-on-Chip Microdevices. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 21, 219–239. DOI:10.1146/annurev-bioeng-060418-052305.
16. ECHEVERRIA MOLINA, M. I., MALOLLARI, K. G. a KOMVOPOULOS, K., **2021**. Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. ISSN 2296-4185.
17. EL HARANE, S., ZIDI, B., EL HARANE, N. a kol., **2023**. Cancer Spheroids and Organoids as Novel Tools for Research and Therapy: State of the Art and Challenges to Guide Precision Medicine. *Cells*. 12(7), 1001. ISSN 2073-4409. DOI:10.3390/cells12071001.
18. FANG, G., CHEN, Y.-C., LU, H. a kol., **2023**. Advances in Spheroids and Organoids on a Chip. *Advanced Functional Materials*. 33(19), 2215043. ISSN 1616-3028. DOI:10.1002/adfm.202215043.
19. GAO, B., JING, C., NG, K. a kol., **2019**. Fabrication of three-dimensional islet models by the geometry-controlled hanging-drop method. *Acta Mechanica Sinica*. 35(2), 329–337. ISSN 1614-3116. DOI:10.1007/s10409-019-00856-z.
20. GARDNER, J. K. a HERBST-KRALOVETZ, M. M., **2016**. Three-Dimensional Rotating Wall Vessel-Derived Cell Culture Models for Studying Virus-Host Interactions. *Viruses*. 8(11), 304. ISSN 1999-4915. DOI:10.3390/v8110304.
21. GHOSH, S. a SRIVASTAVA, N., **2022**. Spinner Flask Bioreactor in Tissue Engineering. *YMER Digital*. 21(06), 611–626. ISSN 00440477. DOI:10.37896/YMER21.06/61.
22. GODWIN, A. R. F., SINGH, M., LOCKHART-CAIRNS, M. P. a kol., **2019**. The role of fibrillin and microfibril binding proteins in elastin and elastic fibre assembly. *Matrix Biology*. 84, 17–30. ISSN 0945-053X. DOI:10.1016/j.matbio.2019.06.006.
23. GRAHAM, K. a UNGER, E., **2018**. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*. 13, 6049–6058. ISSN 1176-9114. DOI:10.2147/IJN.S140462.

24. GUPTA, N., LIU, J. R., PATEL, B. a kol., **2016**. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioengineering & Translational Medicine*. 1(1), 63–81. ISSN 2380-6761. DOI:10.1002/btm2.10013.
25. HAN, S. J., KWON, S. a KIM, K. S., **2021**. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International*. 21(1), 152. ISSN 1475-2867. DOI:10.1186/s12935-021-01853-8.
26. HANASTI, N., FARIDAH, L., FIBRIANI, A. a kol., **2023**. The Use of Biomaterials in Three-Dimensional Culturing of Cancer Cells. *Current Issues in Molecular Biology*. 45(2), 1100–1112. ISSN 1467-3045. DOI:10.3390/cimb45020073.
27. HOARAU-VÉCHOT, J., RAFII, A., TOUBOUL, C. a kol., **2018**. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences*. 19(1), 181. ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms19010181.
28. HUANG, X., HUANG, Z., GAO, W. a kol., **2022**. Current Advances in 3D Dynamic Cell Culture Systems. *Gels*. 8(12), 829. ISSN 2310-2861. DOI:10.3390/gels8120829.
29. CHEN, A. K.-L., CHEN, X., CHOO, A. B. H. a kol., **2011**. Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. 7(2), 97–111. ISSN 1873-5061. DOI:10.1016/j.scr.2011.04.007.
30. CHEN, Y., ed., **2020**. Hydrogels based on natural polymers. Amsterdam Kidlington, Oxford Cambridge, MA: Elsevier. ISBN 978-0-12-816421-1.
31. CHO, S., LEE, S. a AHN, S. I., **2023**. Design and engineering of organ-on-a-chip. *Biomedical Engineering Letters*. 13(2), 97–109. ISSN 2093-985X. DOI:10.1007/s13534-022-00258-4.
32. INO, K., ITO, A. a HONDA, H., **2007**. Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnology and Bioengineering*. 97(5), 1309–1317. ISSN 0006-3592, 1097-0290. DOI:10.1002/bit.21322.
33. JEGER-MADIOT, N., ARAKELIAN, L., SETTERBLAD, N. a kol., **2021**. Self-organization and culture of Mesenchymal Stem Cell spheroids in acoustic levitation. *Scientific Reports*. 11(1), 8355. ISSN 2045-2322. DOI:10.1038/s41598-021-87459-6.
34. JENSEN, C. a TENG, Y., **2020**. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*. 7, 33. ISSN 2296-889X. DOI:10.3389/fmolb.2020.00033.
35. JEONG, Y., TIN, A. a IRUDAYARAJ, J., **2022**. Flipped Well-Plate Hanging-Drop Technique for Growing Three-Dimensional Tumors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10, 898699. ISSN 2296-4185. DOI:10.3389/fbioe.2022.898699.

36. KAPAŁCZYŃSKA, M., KOLENDA, T., PRZYBYŁA, W. a kol., **2018**. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science: AMS*. 14(4), 910–919. ISSN 1734-1922. DOI:10.5114/aoms.2016.63743.
37. KAPPES, M., FRIEDRICH, B., PFISTER, F. a kol., **2022**. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cell Seeding: Magnetic Patterning and Magnetic 3D Cell Culture. *Advanced Functional Materials*. 32(50), 2203672. ISSN 1616-3028. DOI:10.1002/adfm.202203672.
38. KNIGHT, E. a PRZYBORSKI, S., **2015**. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy*. 227(6), 746–756. ISSN 0021-8782. DOI:10.1111/joa.12257.
39. KOJIMA, N., TAKEUCHI, S. a SAKAI, Y., **2011**. Establishment of self-organization system in rapidly formed multicellular heterospheroids. *Biomaterials*. 32(26), 6059–6067. ISSN 0142-9612. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.04.081.
40. KOSHKIN, V., AILLES, L. E., LIU, G. a kol., **2017**. Preservation of the 3D Phenotype Upon Dispersal of Cultured Cell Spheroids Into Monolayer Cultures. *Journal of Cellular Biochemistry*. 118(1), 154–162. ISSN 0730-2312, 1097-4644. DOI:10.1002/jcb.25621.
41. KOWALCZYK, A. P. a GREEN, K. J., **2013**. Structure, Function and Regulation of Desmosomes. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 116, 95–118. ISSN 1877-1173. DOI:10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4.
42. KOYYADA, A. a ORSU, P., **2021**. Recent Advancements and Associated Challenges of Scaffold Fabrication Techniques in Tissue Engineering Applications. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. 7(2), 147–159. ISSN 2364-4141. DOI:10.1007/s40883-020-00166-y.
43. KULAR, J. K., BASU, S. a SHARMA, R. I., **2014**. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*. 5, 2041731414557112. ISSN 2041-7314. DOI:10.1177/2041731414557112.
44. KULCHAR, R. J., DENZER, B. R., CHAVRE, B. M. a kol., **2021**. Use of Microparticles for Cartilage Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(19), 10292. ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms221910292.
45. KUYSTERMANS, D. a AL-RUBEAI, M., **2011**. Bioreactor Systems for Producing Antibody from Mammalian Cells. s. 25–52. ISBN 978-94-007-1256-0. DOI:10.1007/978-94-007-1257-7_2.
46. LEE, S. Y., KOO, I. S., HWANG, H. J. a LEE, D. W., **2023**. In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discovery*. 28(4), 119–137. ISSN 2472-5552, 2472-5560. DOI:10.1016/j.slasd.2023.03.006.

47. LEUNG, C. M., DE HAAN, P., RONALDSON-BOUCHARD, K. a kol., **2022**. A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers*. 2(1), 1–29. ISSN 2662-8449. DOI:10.1038/s43586-022-00118-6.
48. LICATA, J. P., SCHWAB, K. H., HAR-EL, Y. E. a kol., **2023**. Bioreactor Technologies for Enhanced Organoid Culture. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(14), 11427. ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms241411427.
49. LIN, R. Z. a CHANG, H. Y., **2008**. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*. 3(9–10), 1172–1184. ISSN 1860-7314. DOI:10.1002/biot.200700228.
50. LIN, R. Z., CHOU, L. F., CHIEN, C.-C. M. a kol., **2006**. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin. *Cell and Tissue Research*. 324(3), 411–422. ISSN 0302-766X, 1432-0878. DOI: 10.1007/s00441-005-0148-2,.
51. LIU, D., CHEN, S. a NAING, M. W., **2021**. A review of manufacturing capabilities of cell spheroid generation technologies and future development. *Biotechnology and Bioengineering*. 118(2), 542–554. ISSN 1097-0290. DOI: 10.1002/bit.27620.
52. MAHDIEH, Z., CHERNE, M. D., FREDRIKSON, J. P. a kol., **2022**. Granular Matrigel: restructuring a trusted extracellular matrix material for improved permeability. *Biomedical Materials*. 17(4), 045020. ISSN 1748-605X. DOI: 10.1088/1748-605X/ac7306.
53. MEHTA, G., HSIAO, A. Y., INGRAM, M. a kol., **2012**. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*. 164(2), 192–204. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.04.045.
54. MEROTTO, E., PAVAN, P. G. a PICCOLI, M., **2023**. Three-Dimensional Bioprinting of Naturally Derived Hydrogels for the Production of Biomimetic Living Tissues: Benefits and Challenges. *Biomedicines*. 11(6), 1742. ISSN 2227-9059. DOI: 10.3390/biomedicines11061742.
55. PARK, W., GAO, G. a CHO, D. W., **2021**. Tissue-Specific Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for Musculoskeletal Tissue Regeneration and Modeling Using 3D Bioprinting Technology. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(15), 7837. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms22157837.
56. PENG, X., HE, W., XIN, F. a kol., **2020**. Standing surface acoustic waves, and the mechanics of acoustic tweezer manipulation of eukaryotic cells. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 145, 104134. ISSN 0022-5096. DOI: 10.1016/j.jmps.2020.104134.
57. RAGHAVAN, S., MEHTA, P., HORST, E. N. a kol., **2016**. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget*. 7(13), 16948–16961. ISSN 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.7659.

58. RICHBOURG, N. R., PEPPAS, N. A. a SIKAVITSAS, V. I., **2019**. Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 13(8), 1275–1293. ISSN 1932-6254. DOI: 10.1002/term.2859.
59. RODRIGUES, C. A. V., FERNANDES, T. G., DIOGO, M. M. a kol., **2011**. Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnology Advances*. 29(6), 815–829. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.009.
60. RYU, N.-E., LEE, S.-H. a PARK, H., **2019**. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 8(12), 1620. ISSN 2073-4409. DOI: 10.3390/cells8121620.
61. SANT, S. a JOHNSTON, P. A., **2017**. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*. 23, 27–36. ISSN 17406749. DOI: 10.1016/j.ddtec.2017.03.002.
62. SEO, J. Y., PARK, S. B., KIM, S. Y. a kol., **2023**. Acoustic and Magnetic Stimuli-Based Three-Dimensional Cell Culture Platform for Tissue Engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 20(4), 563–580. ISSN 2212-5469. DOI: 10.1007/s13770-023-00539-8.
63. SHAFIAIE, S., HUTTER, V., BROWN, M. B. a kol., **2017**. Influence of surface geometry on the culture of human cell lines: A comparative study using flat, round-bottom and v-shaped 96 well plates. *PLoS ONE*. 12(10), e0186799. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0186799.
64. SHARMA, R., HARRISON, S. T. L. a TAI, S. L., **2022**. Advances in Bioreactor Systems for the Production of Biologicals in Mammalian Cells. *ChemBioEng Reviews*. 9(1), 42–62. ISSN 2196-9744. DOI: 10.1002/cben.202100022.
65. SILVA, J. C., CARVALHO, M. S., HAN, X. a kol., **2019**. Compositional and structural analysis of glycosaminoglycans in cell-derived extracellular matrices. *Glycoconjugate Journal*. 36(2), 141–154. ISSN 0282-0080. DOI: 10.1007/s10719-019-09858-2.
66. SINGH, S. K., ABBAS, S., SAXENA, A. K. a kol., **2020**. Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome. *BioTechniques*. 69(5), 333–338. ISSN 0736-6205. DOI: 10.2144/btn-2020-0081.
67. SRIPHUTKIAT, Y., KASETSIRIKUL, S. a ZHOU, Y., **2018**. Formation of cell spheroids using Standing Surface Acoustic Wave (SSAW). *International Journal of Bioprinting*. 4(1), 1–12. ISSN 2424-8002. DOI: 10.18063/ijb.v4i1.130.
68. STEPHENSON, M. a GRAYSON, W., **2018**. Recent advances in bioreactors for cell-based therapies. *F1000Research*. 7, F1000 Faculty Rev-517. ISSN 2046-1402. DOI: 10.12688/f1000research.12533.1.

69. SUN, B., **2021**. The mechanics of fibrillar collagen extracellular matrix. *Cell Reports Physical Science*. 2(8), 100515. ISSN 2666-3864. DOI: 10.1016/j.xcrp.2021.100515.
70. SUN, M., LIU, A., YANG, X. a kol., **2021**. 3D Cell Culture—Can It Be As Popular as 2D Cell Culture? *Advanced NanoBiomed Research*. 1(5), 2000066. ISSN 2699-9307. DOI: 10.1002/anbr.202000066.
71. THEOCHARIS, A. D., SKANDALIS, S. S., GIALELI, C. a kol., **2016**. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 97, Extracellular Matrix (ECM) and ECM-like materials: *Therapeutic Tools and Targets in Cancer Treatment*, 4–27. ISSN 0169-409X. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
72. TREGIDGO, M., DORN, M., LUCAS, C. a kol., **2023**. Design and characterization of a novel perfusion reactor for biopharmaceuticals production. *Chemical Engineering Research and Design*. 194, 344–357. ISSN 0263-8762. DOI: 10.1016/j.cherd.2023.04.066.
73. TUNG, Y.-C., HSIAO, A. Y., ALLEN, S. G. a kol., **2011**. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *The Analyst*. 136(3), 473–478. ISSN 0003-2654. DOI: 10.1039/c0an00609b.
74. VARLEY, M. C., MARKAKI, A. E. a BROOKS, R. A., **2017**. Effect of Rotation on Scaffold Motion and Cell Growth in Rotating Bioreactors. *Tissue Engineering Part A*. 23(11–12), 522–534. ISSN 1937-3341. DOI: 10.1089/ten.tea.2016.0357.
75. VILLALONA, G. A., UDELSMAN, B., DUNCAN, D. R. a kol., **2010**. Cell-Seeding Techniques in Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B Reviews*. 16(3), 341–350. ISSN 1937-3368. DOI: 10.1089/ten.teb.2009.0527.
76. VISHAL, P., **2016**. Scaffolds: Porous Scaffold for Modulated Drug Delivery. *Austin Therapeutics*. 3, 1027.
77. WEAVER, J. D. a GARCÍA, A. J., **2019**. Engineering Artificial Niches for Regenerative Medicine. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. B.m.: Elsevier, s. B9780128012383111286. ISBN 978-0-12-801238-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.11128-6.
78. WU, L., AI, Y., XIE, R. a kol., **2023**. Organoids/organs-on-a-chip: new frontiers of intestinal pathophysiological models. *Lab on a Chip*. 23(5), 1192–1212. ISSN 1473-0189. DOI: 10.1039/D2LC00804A.
79. YOKOI, F., DEGUCHI, S. a TAKAYAMA, K., **2023**. Organ-on-a-chip models for elucidating the cellular biology of infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1870(6), 119504. ISSN 0167-4889. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2023.119504.