

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

NIKOLA MACHOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Příprava a kultivace buněčných sféroidů

Bakalářská práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Preparation and Cultivation of Cell Spheroids

Bachelor Thesis

2025

Nikola Machová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikola Machová**
Osobní číslo: **C22218**
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Příprava a kultivace buněčných sféroidů**
Téma práce anglicky: **Production and Cultivation of Cell Spheroids**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši zaměřenou na 3D kultivaci buněk uspořádaných do podoby sféroidů. V úvodní části bakalářské práce popište aktuální možnosti 2D a 3D kultivace buněk. Dále se zaměřte zejména na 3D kultivace buněk a definujte rozdíly mezi sféroidy a organoidy.
- 2) V hlavní části bakalářské práce shrňte kultivační podmínky nezbytné pro tvorbu buněčných sféroidů, popište možnosti jejich formování, a to včetně dostupných kultivačních plastů. Zaměřte se také na charakterizaci buněčných sféroidů z pohledu jejich ideálního počtu, velikostí a excentricity. Uveďte také možnosti využití pokročilých bioanalytických metod, jako jsou testy pro stanovení dehydrogenázové aktivity, množství ATP atd. u sféroidů. Zmiňte i nevýhody spojené s testováním cytotoxicity látek na buněčných sféroidech. V závěru práce shrňte aktuální studie, které se charakterizací buněčných sféroidů zabývají.
- 3) Jako primární zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované 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: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem „Příprava a kultivace buněčných sféroidů“ 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 30. 06. 2025

Nikola Machová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce, panu doktoru RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D., za nekonečnou trpělivost, odborné vedení, cenné rady a ochotu při psaní této práce. Dále děkuji Mgr. Lence Tiché a jejím kolegům za čas, který mi věnovali v rámci názorné ukázky v laboratořích.

Děkuji své rodině a blízkým přátelům za podporu, pochopení a povzbuzení ve chvíli, kdy jsem to nejvíc potřebovala.

Ještě jednou Vám všem upřímně děkuji. Bez Vás bych to nezvládla.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá přípravou a kultivací buněčných sféroidů jako reprezentativních 3D modelů pro biomedicínský výzkum. Popisuje principy jejich vzniku, metody kultivace a dále způsoby hodnocení jejich životaschopnosti a metabolické aktivity. Pozornost je věnována také jejich aplikacím v onkologii, farmakologii a personalizované medicíně. Následuje porovnání s jinými buněčnými modely, především organoidy, které mají důležitou roli například v pozorování mechanismů onemocnění. Zdůrazněn je zejména význam sféroidů, z hlediska vývoje nových terapeutických postupů.

KLÍČOVÁ SLOVA

sféroidy, organoidy, kultivace buněk *in vitro*, buněčné linie

TITLE

Preparation and Cultivation of Cell Spheroids

ANNOTATION

The bachelor's thesis addresses the preparation and cultivation of cell spheroids as representative 3D models for biomedical research. It describes the principles of their formation, cultivation methods, and the ways of assessing their viability and metabolic activity. Attention is also given to their applications in oncology, pharmacology, and personalized medicine. This is followed by a comparison with other cell models, especially organoids, which play an important role, for example, in observing disease mechanisms. Emphasis is placed particularly on the significance of spheroids, in terms of mimicking *in vivo* conditions, for the development of new therapeutic approaches.

KEYWORDS

Spheroids, organoids, *in vitro* cell culture, cell lines

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD.....	13
1 Buněčná kultivace.....	14
1.1 Kultivace v ploše	14
1.2 Kultivace v prostoru.....	15
1.3 Porovnání kultivace v ploše a prostorové kultivace	18
1.4 3D biotisk.....	20
2 Sféroidy.....	21
2.1 Charakterizace buněčných sféroidů	22
2.2 Metody přípravy sféroidů	24
2.2.1 Kultivace metodou visící kapky	24
2.2.2 Agitační a rotační kultivace	25
2.2.3 Kultivace na nepřilnavých površích s překrytím kapalinou	25
2.2.4 <i>Scaffold-based</i> přístupy kultivace.....	27
2.2.5 Kultivace pomocí mikrofluidních systémů.....	28
2.2.6 Kultivace metodou magnetické a akustické levitace	29
2.2.7 Kultivace metodou SHIBS.....	30
2.2.8 Kultivace pomocí mikrokavitního pole	31
2.2.9 Kultivace na mikronosičích (<i>microcarrier-based</i> kultivace).....	31
2.3 Hodnocení viability a metabolické aktivity sféroidů.....	32
2.3.1 Stanovení dehydrogenázové aktivity	32
2.3.2 Stanovení množství ATP	33
2.3.3 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy.....	33
2.4 Buněčné linie vhodné pro přípravu sféroidů.....	33
2.5 Aplikace sféroidů.....	35
2.5.1 Onkologický výzkum a testování cytotoxických látek.....	35
2.5.2 Toxikologie a farmaceutický screening.....	35
2.5.3 Personalizovaná medicína.....	36
2.5.4 Imunologické aplikace	36

3	Organoidy	37
3.1	Metody přípravy organoidů	37
3.2	Aplikace organoidů.....	39
3.2.1	Střevní (gastrointestinální) organoidy	39
3.2.2	Mozkové (cerebrální) organoidy	40
3.2.3	Jaterní organoidy.....	40
3.2.4	Organoidy dýchacích cest.....	41
3.2.5	Nádorové organoidy a personalizovaná medicína	41
3.2.6	Organoidy v buněčné a molekulární diagnostice.....	42
4	Porovnání organoidů a sféroidů.....	44
4.1	Úskalí aplikací sféroidů a organoidů	45
4.1.1	Variabilita	45
4.1.2	Difúzní limity.....	45
4.1.3	Heterogenita buněčných zdrojů a diferenciaci	46
4.1.4	Technické a analytické limity	46
4.1.5	Extracelulární matrix a materiálová variabilita.....	46
4.1.6	Složení a fyziologická relevance kultivačních médií	46
4.1.7	Reprodukovatelnost, rozlišitelnost a náklady	47
	ZÁVĚR.....	48
	POUŽITÁ LITERATURA	49

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: 2D kultivace buněk	15
Obrázek 2: 3D kultivace	16
Obrázek 3: Sféroidy pod světelným mikroskopem.....	21
Obrázek 4: Charakterizace sféroidů.....	23
Obrázek 5: Schéma metody visící kapky.....	24
Obrázek 6: Schéma agitační a rotační metody.....	25
Obrázek 7: Schéma U-bottom jamky.....	26
Obrázek 8: Droplet-based mikrofluidika	28
Obrázek 9: Schéma mikrofluidní platformy	29
Obrázek 10: Schéma metody magnetické levitace	30
Obrázek 11: Schéma air-liquid interface (ALI).....	38
Obrázek 12: Aplikace organoidů odvozených z fyziologických buněk	39
Obrázek 13: Aplikace organoidů odvozených z nádorových buněk	42
Tabulka 1: Porovnání 2D a 3D kultivace.....	19
Tabulka 2: Porovnání sféroidů a organoidů.....	44

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2D	dvourozměrná
3D	třírozměrná
ALI	rozhraní vzduch-kapalina
ATP	adenosintrifosfát
CFTR	transmembránový regulátor vodivosti cystické fibrózy
CRISPR	shluky pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetič
dECM	decelularizovaná extracelulární matrix
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
ECM	extracelulární matrice/matrix
ESCs	embryonální kmenové buňky
F12	živný roztok F12 podle Hama
FBS	fetální bovinní sérum
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonová kyselina
HIF-1α	hypoxií indukovaný faktor 1 alfa
HIT-CF	inovační klinická studie pro cystickou fibrózu
HPLM	živné médium podobné lidské plazmě
HTS	vysokokapacitní screening
IC₅₀	50% inhibiční koncentrace
iPSCs	indukované pluripotentní kmenové buňky
LDH	laktátdehydrogenáza
MSC	mezenchymální kmenová buňka
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
p53	protein 53
PCL	polykaprolaktonová vlákna
PDMS	polydimethylsiloxan
PDO	organoidy odvozené od patientských buněk
PDS	sféroidy odvozené od patientských buněk
PDTO	organoidy odvozené od patientských nádorových buněk
PEG	polyethylenglykol
PGA	kyselina polyglutamová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kyselina poly(mléčná-co-glykolová)
Poly(HEMA)	poly(hydroxyethylmethakrylát)

PVA	polyvinylalkohol
OSTE+	epoxidy thiol-ene připravené mimo stechiometrické poměry
RSV	respirační syncytiální virus
RWV	bioreaktor s rotující stěnou
SARS-CoV-2	koronavirus spřízněný se syndromem těžkého akutního respiračního selhání
SHIBS	biomimetický systém integrující sférody a hydrogely
TUNEL	Značení konců přerušných řetězců DNA pomocí dUTP a terminální deoxynukleotidyltransferázy
ULA	ultranepřilnavý povrch
UV	ultrafialová
WST-1	4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen

ÚVOD

V posledních desetiletích dochází k výraznému rozvoji *in vitro* modelů, které se snaží co nejvěrněji napodobit prostředí živého organismu. Tradiční v ploše rostoucí buněčné kultury jsou stále hojně využívány, mají však řadu omezení. Buňky pěstované ve dvojrozměrném prostředí se chovají jinak než v přirozenějším trojrozměrném prostředí organismu. Liší se v morfologii, metabolismu, genové expresi i citlivosti na léčiva. Tyto nedostatky vedly k rozvoji prostorových kultivačních systémů, mezi které patří zejména sféroidy a organoidy.

Sféroidy jsou trojrozměrné shluky buněk, které vznikají spontánní agregací a samouspořádáním buněk v prostředí podporujícím růst bez pevné adheze k povrchu. Jsou cenným modelem pro výzkum nádorového mikroprostředí, testování cytotoxických látek, studium buněčné diferenciaci i pro aplikaci v personalizované medicíně. Oproti dvourozměrným kulturám lépe imitují *in vivo* podmínky, včetně vzniku fyziologických gradientů kyslíku, živin a metabolitů, což umožňuje realističtější hodnocení účinků léčiv a studium buněčných mechanismů.

Cílem této práce je poskytnout ucelený přehled o metodách přípravy a kultivace buněčných sféroidů, jejich fyzikálních a biologických vlastnostech, hodnocení jejich viability a metabolické aktivity a možnostech praktického využití v biomedicinském výzkumu. Dále je práce zaměřena na porovnání různých aplikačních přístupů, od jednodušších, jako je metoda visící kapky, až po sofistikované systémy, jako jsou mikrofluidní čipy nebo magnetická levitace. Práce se rovněž věnuje porovnávání sféroidů s dalšími trojrozměrnými modely, zejména organoidy, a shrnuje výhody, nevýhody a úskalí spojená s jejich aplikacemi.

Motivací pro výběr tohoto tématu je aktuální celosvětový zájem a rychle rostoucí význam trojrozměrných modelů napříč medicínskými a farmakologickými oblastmi a potřeba hlubšího porozumění jejich využitelnosti. Schopnost připravit kvalitní sféroidy, charakterizovat jejich vlastnosti a správná interpretace výsledků testování je v dnešní době zásadní pro převedení laboratorního výzkumu do klinické praxe.

1 Buněčná kultivace

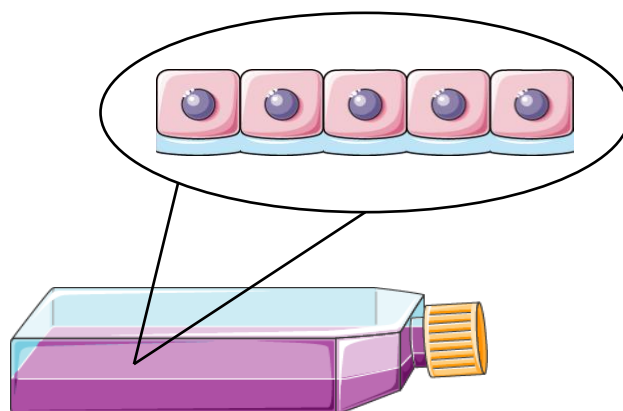
Při kultivacích buněčných kultur se pracuje s různými typy buněk. Zaprvé s primárními buňkami, které jsou izolované přímo z tkáně a zachovávají si fenotyp i funkci původní tkáně. Nebo zadruhé s nádorovými buněčnými liniemi, což jsou imortalizované rakovinné buňky, které slouží jako modely pro testování léčiv. Dlouhodobé pěstování monovrstev však vede ke ztrátě biologické heterogenity a vzniku homogenní populace odlišné od původního nádoru (Pipiya et al., 2024). Dále lze využít i kmenové buňky, embryonální či somatické, které se vyznačují schopností sebeobnovy a diferenciací (Górska et al., 2024). V neposlední řadě lze využít i uměle imortalizované buněčné linie, které jsou upraveny tak, aby se dělily neomezeně. Díky tomu často v experimentech nahrazují primární kultury. Jejich nevýhodou je však to, že často trpí genetickou nestabilitou (Górska et al., 2024; Pipiya et al., 2024).

Buněčná kultivace probíhá za přísně definovaných podmínek. Standardem je teplota 37 °C, 5 % CO₂, pH 7,2–7,4 a vysoká relativní vlhkost ≈ 95 %. Pro zajištění těchto podmínek se používají sterilní inkubátory (Din et al., 2024). Je nutné striktně dodržovat aseptické postupy, aby se zabránilo kontaminaci kultur mikroorganismy či mykoplazmaty, k čemuž se využívají laminární boxy, sterilizované nástroje a filtrované roztoky. Média, která se používají pro kultivaci buněk všeobecně obsahují vodu, minerální soli, aminokyseliny, glukózu, vitamíny a často také sérové proteiny, například FBS, jako zdroj růstových faktorů. Médium také musí být stabilizováno pufrem pro udržení konstantního pH. Nejčastěji se jedná o NaHCO₃/CO₂ nebo 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonová kyselina (HEPES). Pro snazší sledování změn pH je často využívána fenolová červeň, která zároveň dává kultivačnímu médiu typickou růžovočervenou barvu. Při práci v buněčné laboratoři je nezbytné provádět pravidelnou kontrolu médií (Weiskirchen et al., 2023).

1.1 Kultivace v ploše

Kultivace v ploše neboli dvourozměrná (2D) kultivace je běžně využívaná metoda pro dlouhodobé udržení a rozmnožování buněčných kultur, které jsou následně dále využívány. Buňky jsou získávány přímo izolací z fyziologických, ale i maligně transformovaných tkání (Duval et al., 2017). Mohou, ale být připravovány kultivací z již existujících buněčných linií. Jsou kultivovány v médiích obsahujících živiny, růstové faktory a hormony, a rostou ve formě monovrstvy v kultivačních nádobách

ze skla nebo plastu na rovném povrchu (Obr. 1), při dané teplotě (Białkowska et al., 2020).



Obrázek 1: 2D kultivace buněk, převzato z (Servier, 2021)

Tato metoda je hojně využívána pro svou jednoduchost, reprodukovatelnost a nízké náklady. Nicméně u tohoto typu kultivace jsou zaznamenávány nevýhody, jako je omezená schopnost napodobit prostředí *in vivo* a odlišnosti v morfologii (Basu et al., 2021). Buňky jsou zploštělejší a roztaženější. Dále jsou omezené interakce buňka-buňka i buňka-extracelulární matrice. Všechny tyto faktory mohou ovlivnit buněčný metabolismus, fenotyp a odpověď na testované látky, což může vést ke zkreslení výsledků (Basu et al., 2021; Białkowska et al., 2020).

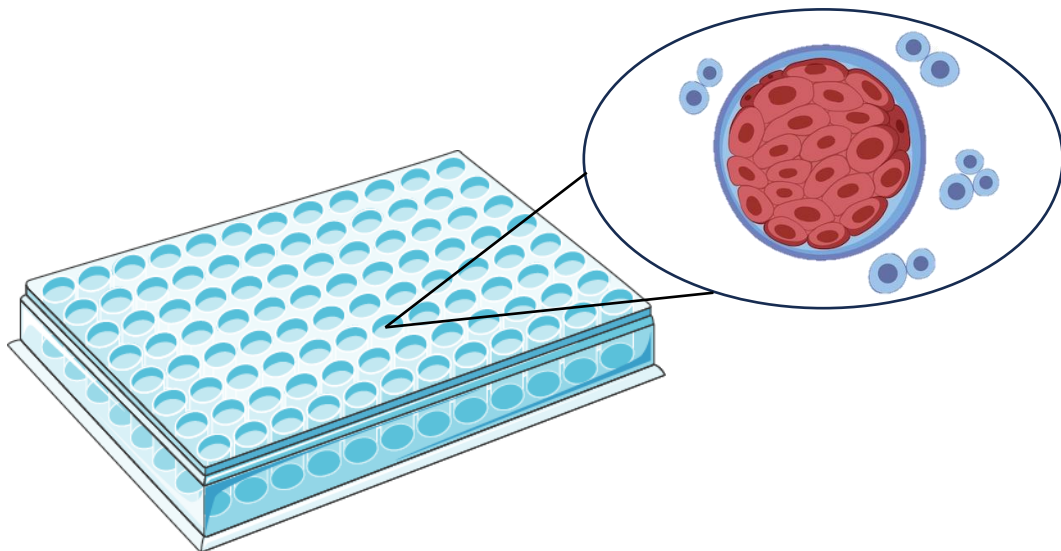
1.2 Kultivace v prostoru

Kultivace v prostoru neboli trojrozměrná (3D) kultivace představuje moderní technologii, která se postupně vyvíjela jako odpověď na omezení 2D kultivace. První snahy o vytvoření 3D kultur byly motivovány potřebou vytvořit prostředí, které by přesněji a efektivněji napodobovalo podmínky *in vivo*. Prostorově uspořádané struktury umožňují buňkám růst ve všech směrech a interagovat nejen s okolními buňkami, ale také s extracelulární matricí (ECM) (Fontoura et al., 2020). Díky tomuto přístupu vykazují buňky více podobností s buňkami a orgány lidského těla, což usnadňuje vývoj realističtějších modelů pro výzkum nemocí a testování léčiv.

Ačkoliv se může zdát, že 3D kultivace je novodobou technologií, její základy sahají až více než 100 let zpět. Již v roce 1907 Wilson a kol. popsali schopnost disociovaných buněk houby reorganizovat celý organismus, čímž položili základy konceptu buněčné samoorganizace. Ve stejném roce byla zavedena metoda visící kapky pro kultivaci

nervových vláken žabího embrya. Během následujících dekád byly prováděny různé pokusy s disociací a reagrací buněk různých tkání, což vyústilo až ve vznik prvních mnohobuněčných sférických útvarů v roce 1971. Významným milníkem se pak stalo zavedení kultivace kmenových buněk, zejména embryonálních (ESCs) a později i indukovaných pluripotentních (iPSCs), které otevřely cestu k vývoji komplexních 3D struktur (Kim et al., 2023), jako jsou sféroidy a organoidy.

3D buněčné kultury jsou typicky vytvářeny v prostředí, které napodobuje přirozené podmínky organismu. Používají se buď metody využívající scaffoldy (nosné struktury) nebo metody bez využití scaffoldů (Obr. 2), přičemž v obou případech je zajištěna dodávka živin, kyslíku a léčiv prostřednictvím gradientů difúze (Białkowska et al., 2020; Fontoura et al., 2020).



Obrázek 2: 3D kultivace, převzato z (Raza et al., 2025; Servier, 2021)

Scaffold, neboli lešení, je třírozměrná porézní struktura, která poskytuje buňkám mechanickou oporu a napodobuje extracelulární matrix. Tyto nosné materiály mají typicky otevřenou, pórovitou síť pro difuzi živin, kyslíku a odvod odpadních látek. Scaffoldy jsou zpravidla biokompatibilní a často biologicky odbouratelné materiály, umožňující buněčné uchycení, proliferaci a tvorbu tkání (Abuwatfa et al., 2024; Loh et al., 2013).

Podle struktury se scaffoldy dělí na 3 hlavní typy. Porézní (sponge) systémy vznikají například zmrazováním nebo pískováním, přičemž vzniklé trojrozměrné houby disponují vysoce propojenou makropórovou sítí, která usnadňuje prostup živin i odvod metabolitů do nitra konstrukce, a tím podporuje stabilní růst buněk (Loh et al., 2013). Vlákenní

scaffolds pak sestávají z nanovláken, například elektrostaticky spořádaných, která věrně napodobují jemnou síť extracelulární matrix a poskytují velmi specifický povrch pro uchycení a migraci buněk (Li et al., 2021). Do třetice gelové/pěnové formy (foam-templating) využívají fyzikální či chemické gelace, případně pěnování, k vytvoření měkké hydrogelové matrice s drobnými póry, vhodnými zejména pro kultivaci citlivých buněk, jelikož minimalizují mechanický stres a zachovávají vysokou vodnatost prostředí (Ma et al., 2022).

Z hlediska materiálového rozdělení rozlišujeme přírodní polymery, jako jsou kolagen, želatina, hyaluronan, chitosan nebo alginát, které jsou biokompatibilní a obsahují biologické motivační sekvence podporující buněčnou adhezi, avšak jejich nevýhodou je větší heterogenita a nižší mechanická pevnost (Abuwatfa et al., 2024; Li et al., 2021), a syntetické polymery (PLA, PGA, PLGA, PCL, PEG aj.), jež umožňují přesné nastavení mechanických vlastností, tedy tvrdosti a rychlosti degradace. Nevýhodou je, že vyžadují povrchové úpravy k optimalizaci buněčné adheze, protože postrádají přirozené bioaktivní sekvence (Abuwatfa et al., 2024; Li et al., 2021).

Scaffolds se používají v tkáňovém inženýrství pro kultivaci 3D tkáňových modelů, například kostní, chrupavkové nebo cévní náhrady. Díky trojrozměrnému uspořádání podporují diferenciaci buněk a transport látek, což vede k realističtějšímu chování kultur (Li et al., 2021; Loh et al., 2013). Výhodou těchto 3D nosičů oproti plochým kulturám je lepší imitace fyziologického mikroprostředí, naopak nevýhodou je však složitější výroba a obtížnější sledování buněk uvnitř struktury.

Tento přístup umožňuje realistickou simulaci přirozeného mikroprostředí buněk, včetně interakcí mezi buňkami a ECM, jakož i parakrinní signalizace, která hraje klíčovou roli při diferenciaci a funkční organizaci tkání. Právě tyto komplexní interakce jsou klíčové pro správnou samoorganizaci struktur, jako jsou například organoidy, které celkem věrně napodobují nejen morfologii, ale i funkci různých typů lidských tkání (Kim et al., 2023).

Díky pokročilým vlastnostem, jako je větší odolnost proti léčbě a schopnost přesněji napodobovat tvar buněk a interakce buňka-buňka i buňka-prostředí, se 3D buněčné kultury stávají čím dál více důležitým nástrojem v biomedicině (Białkowska et al., 2020). Se stále rostoucími požadavky na sofistikovanější modely a pokroky v biotechnologiích se očekává, že 3D buněčné kultury budou stále rozšiřovány a vylepšovány, aby poskytly

ještě lepší platformy pro studium lidské fyziologie a patologie (Basu et al., 2021). Současný výzkum se rovněž zaměřuje na integraci mikro- a nanoinženýrských přístupů, například mikročipů, vláken nebo 3D biotisku, s cílem zvýšit reprodukovatelnost, výtěžnost a maturaci 3D kultivace (Kim et al., 2023).

1.3 Porovnání kultivace v ploše a prostorové kultivace

Výhodou 2D kultivace je, že buňky rostou na plochých, často speciálně upravených povrchích, jako je plast nebo sklo, kde tvoří monovrstvy (Basu et al., 2021). Populace buněk je zde ale uniformní neboli jednoduchá, což může vést ke zkresleným výsledkům při testování léčiv. Při 3D kultivaci jsou naopak buňky umístěny například do hydrogelů, jako je alginát nebo kolagen, syntetických polymerů, kterým je i polyethylenglykol (PEG) nebo jiných struktur, které napodobují trojrozměrné uspořádání v prostředí extracelulární matrix (Białkowska et al., 2020). Buňky jsou zde heterogennější, což přesněji napodobuje *in vivo* podmínky, a díky tomu můžeme získat přesnější výsledky pro testovaná léčiva (Fontoura et al., 2020).

V případě 2D kultivace interagují buňky pouze na svých perifériích a mají rovnoměrný přístup k živinám a kyslíku, což je nefyziologické (Lee et al., 2023). Právě proto je zde nezbytná pravidelná trypsinace, která napomáhá udržovat dostatečný přísun živin. Problém ale nastává při výměně kultivačního média, která je spojená se ztrátou sekretovaných molekul, což může narušovat probíhající analýzu (Białkowska et al., 2020). Naopak u 3D kultivace dochází k přirozenějším interakcím mezi buňkami a prostředím, včetně tvorby trojrozměrných struktur a zón s odlišnou dostupností kyslíku a živin (Antoni et al., 2015). Takže trypsinace u 3D modelů není nutná, což snižuje riziko zkreslení výsledků a umožňuje delší stabilitu kultur, klidně až 4 týdny. Oproti 2D modelům je zde omezena difuze molekul do média, což umožňuje podrobnější studium například agregace proteinů, jako je amyloid beta (Białkowska et al., 2020).

U nádorových buněk během 2D kultivace je pozorován rychlejší růst, odlišný metabolický profil a citlivost na léčbu, například chemoterapeutiky, je často přeceňována (Duval et al., 2017). Oproti tomu 3D modely lépe napodobují vlastnosti nádorů *in vivo*, včetně nižší rychlosti proliferace, hypoxických oblastí a bariér pro průnik léčiv.

2D kultivace zůstává populární díky své jednoduchosti, nízkým nákladům a širokému využití při základním výzkumu, její omezení v oblasti prediktivity výsledků pro *in vivo* podmínky jsou zřejmá. Na druhou stranu, 3D kultivace, ačkoliv je finančně a technicky náročnější, nabízí mnohem realističtější modely buněčného chování a interakcí. Vyšší náklady na materiály, zařízení a časovou náročnost kompenzuje možnost přesnějšího hodnocení účinnosti a toxicity léčiv, což může vést ke snížení počtu neúspěšných klinických studií a celkově lepším výsledkům v medicínském výzkumu. V budoucnosti lze s rostoucí popularitou očekávat další zdokonalení technologií 3D kultivace, což by mohlo postupně snížit náklady a rozšířit jejich dostupnost i do menších laboratoří (Basu et al., 2021; Białkowska et al., 2020; Fontoura et al., 2020; Lee et al., 2023).

Tabulka 1: Porovnání 2D a 3D kultivace, převzato z (Lee et al., 2023)

Klíčové charakteristiky	2D buněčná kultivace	3D buněčná kultivace
Tvar buněk	Ploché buňky na dně nádoby.	Růst různými směry; vytvářejí přirozený tvar (elipsoid/polarizovaný).
Čas na kultivaci	Minuty až hodiny.	Hodiny až dny.
Rozhraní buněk s médii	Buňky rovnoměrně vystaveny médiu a léčivu.	Média a léčiva pronikají do buněčné hmoty podobně jako <i>in vivo</i> ; povrchové buňky více exponované.
Interakce buněk	Buňky propojené pouze na stranách; interakce s extracelulárním prostředím rozdílná oproti živému organismu.	Buňky interagují víceúrovňově i s extracelulárním prostředím.
Diferenciace a mechanismy buněk	Normální nebo nízká diferenciace; dochází ke změně genové exprese.	Vysoká diferenciace; genová exprese a biochemie buněk podobná <i>in vivo</i> .
Metabolismus léčiv	Nesnadné pozorování metabolismu.	Zvýšená exprese cytochrom P450 enzymů zlepšuje metabolismus léčiv.
Citlivost na léčiva	Všechny přímo exponovány léčivu; citlivá reakce na léčiva.	Buňky vykazují rezistenci a léčiva mají nižší účinnost.
Proliferace buněk	Rychlejší růst než u 3D kultivace; omezená.	Rychlost proliferace závislá na typu buněk a modelu 3D kultivace.
Životaschopnost buněk	Citlivé na cytotoxiny.	Odolnější vůči vnějším stimulům.
Apoptóza	Velmi citlivé na buněčnou smrt vyvolanou léčivem.	Vyšší tolerance vůči stimulaci buněčné smrti vyvolané léčivem.

1.4 3D biotisk

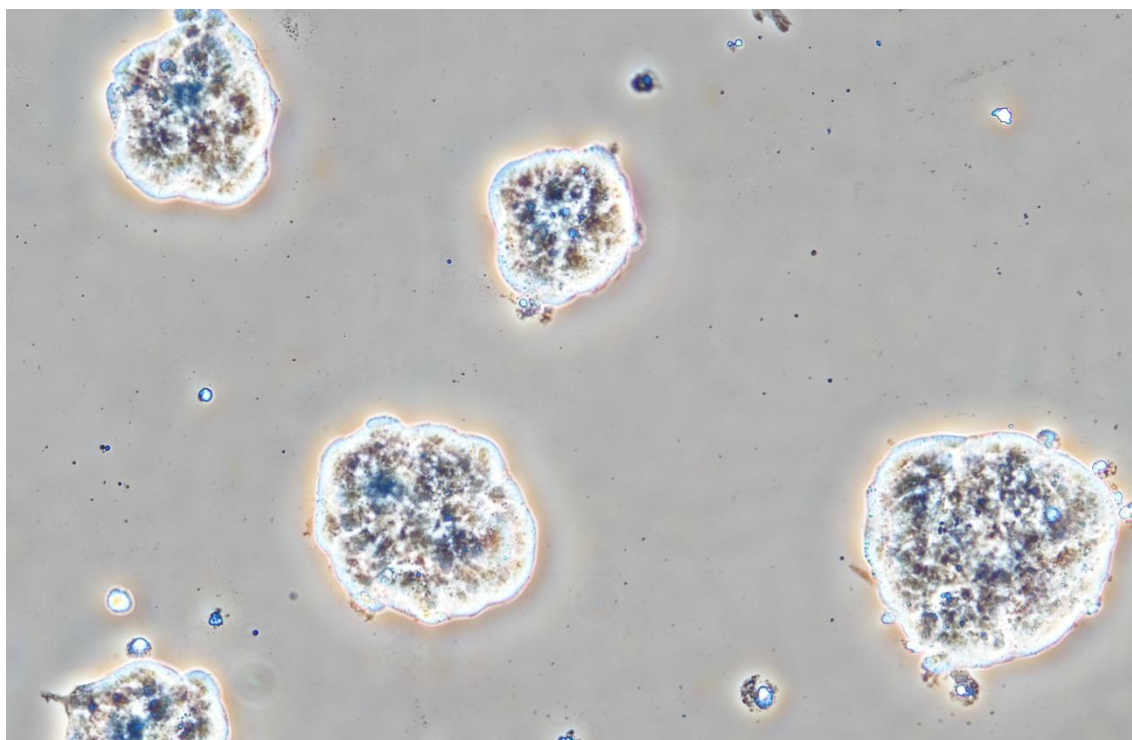
3D biotisk představuje moderní technologii, kdy se vytvářejí trojrozměrné tkáňové konstrukty vrstveným nanášením tzv. bioinků. Bioink je směs buněk, biomateriálů a bioaktivních molekul, které jsou vhodné pro tisk (Mirsky et al., 2024). Tato metoda funguje obdobně jako klasický 3D tisk, ale místo plastu či kovu slouží jako materiál pro tisk živé buňky v hydrogelu. Výhodou biotisku je vysoká přesnost prostorového uspořádání. Umožňuje naplánovat nano-, mikro- i makrostruktury tak, aby napodobovaly přirozenou architekturu tkáně požadované tkáně. Tento postup usnadňuje výrobu složitých heterogenních struktur, kde jsou buňky a podpůrné materiály rozmístěny podobně jako v reálné tkáni. V posledních letech byl 3D biotisk úspěšně aplikován v tkáňovém inženýrství, například v plastické chirurgii se tisknou náhrady kůže, v ortopedii se připravují implantáty kostí a chrupavek a v oční medicíně se testují části sítnice či rohovky vyrobeny pomocí biotisku. Tyto aplikace využívají možnost tisknout personalizované štěpy či modely pro testování léků z buněk přímo od pacienta (Mirsky et al., 2024).

Technologie 3D biotisku má však i své omezení. Mezi hlavní výzvy patří především vybudování cévního systému uvnitř 3D konstruktů pro zajištění výživy a okysličení během růstu. Techniky, které se snaží o formování vaskulárních sítí, jsou například coaxial nebo coaxial-SWIFT. Tyto metody umožňují tvorbu dutých kanálů pokrytých endoteliálními buňkami, což simuluje průtok krve a významně zlepšuje perfúzní kapacitu tkáně (Mohan et al., 2022).

Dosud také není plně vyřešena dlouhodobá životaschopnost velkých biotisknutých orgánů a jejich integrace s tělem po implantaci. Ke spolehlivému výkonu je potřeba přísně regulovat podmínky 3D prostředí, což zahrnuje teplotu, pH, mechanické podmínky a zajistit biokompatibilní složení bioinku. Přesto 3D biotisk umožňuje vytvářet složité struktury a prostorovou heterogenitu blížíící se přirozené tkáňové architektuře a je považován za klíčový nástroj budoucí regenerativní medicíny. Jeho rozvoj nadále podporuje interdisciplinární výzkum, od materiálových věd po bioinženýrství, a v příštích letech lze očekávat stále lepší replikace orgánových modelů, a nakonec snad i možnost tisku funkčních tkáňových náhrad (Mirsky et al., 2024).

2 Sféroidy

Sféroidy představují 3D uspořádané shluky buněk, které převážně tvoří kulovitý útvar (Obr. 3) a vznikají spontánní agregací buněk během kultivace (Ryu et al., 2019). Tento 3D model umožňuje vznik gradientů kyslíku, živin a odpadních látek, charakteristických pro nádorovou mikroarchitekturu, a zároveň vykazují složité mezibuněčné interakce, odlišné profily genové exprese a specifický buněčný metabolismus (Costa et al., 2016; Nunes et al., 2019).



Obrázek 3: Sféroidy pod světelným mikroskopem

Díky těmto vlastnostem nabízí sféroidní kultury vhodnější *in vitro* modely pro studium buněčného chování než monovrstvy. V současnosti jsou považovány za velmi důležitý nástroj při studiu odpovědi na léčiva, zejména v podmínkách blízkých lidské patologii (Guimaraes et al., 2024; Jubelin et al., 2023). Uplatnění nachází zejména v onkologii, kde slouží jako modely pro simulaci rezistence nádorových buněk vůči chemoterapeutikům a pro testování účinnosti léčiv a vývoj nových protinádorových terapií (Nunes et al., 2019). Významně přispívají i k pokrokům v personalizované medicíně. Například kultivace sféroidů z nádorové tkáně konkrétního pacienta umožňuje celkem přesně předpovědět citlivost na daná léčiva (Hofmann et al., 2022).

Kromě onkologie se sféroidy uplatňují také v regenerační medicíně, kde poskytují buňkám přirozenější prostředí pro studium procesů, jako je buněčná diferenciace, migrace

a invaze nádorových buněk či interakce s imunitním systémem (Costa et al., 2016; Ryu et al., 2019). Vzhledem ke své schopnosti lépe rekonstruovat mikroprostředí tkání jsou sféroidy dnes široce využívány jako spolehlivé 3D modely pro studium buněčných mechanismů a vývoj nových terapeutických postupů (Nunes et al., 2019; Ryu et al., 2019).

2.1 Charakterizace buněčných sféroidů

Jednou z charakteristik, kterou u sféroidů popisujeme je velikost. Pro zachování 3D charakteru a dostatečné difúze se doporučuje průměr sféroidu v rozmezí 200–400 μm . menší sféroidy, obvykle pod 150 μm , postrádají gradienty kyslíku, živin a metabolitů, které jsou klíčové pro simulaci *in vivo* mikroprostředí a často se chovají podobně jako 2D kultury (Hirschhaeuser et al., 2010). Naopak větší sféroidy, přesahující 500 μm , trpí výraznou hypoxií ve svém jádru, což vede ke vzniku nekrotických oblastí, snížené proliferaci a zkreslení výsledků testů viability a cytotoxicity (Nath et al., 2016). Správné nastavení velikosti je klíčové zejména v dlouhodobých kulturách nebo při testování farmakologických účinků, kde rovnováha mezi difúzní kapacitou a fyziologickou strukturou sféroidu zásadně ovlivňuje výsledek.

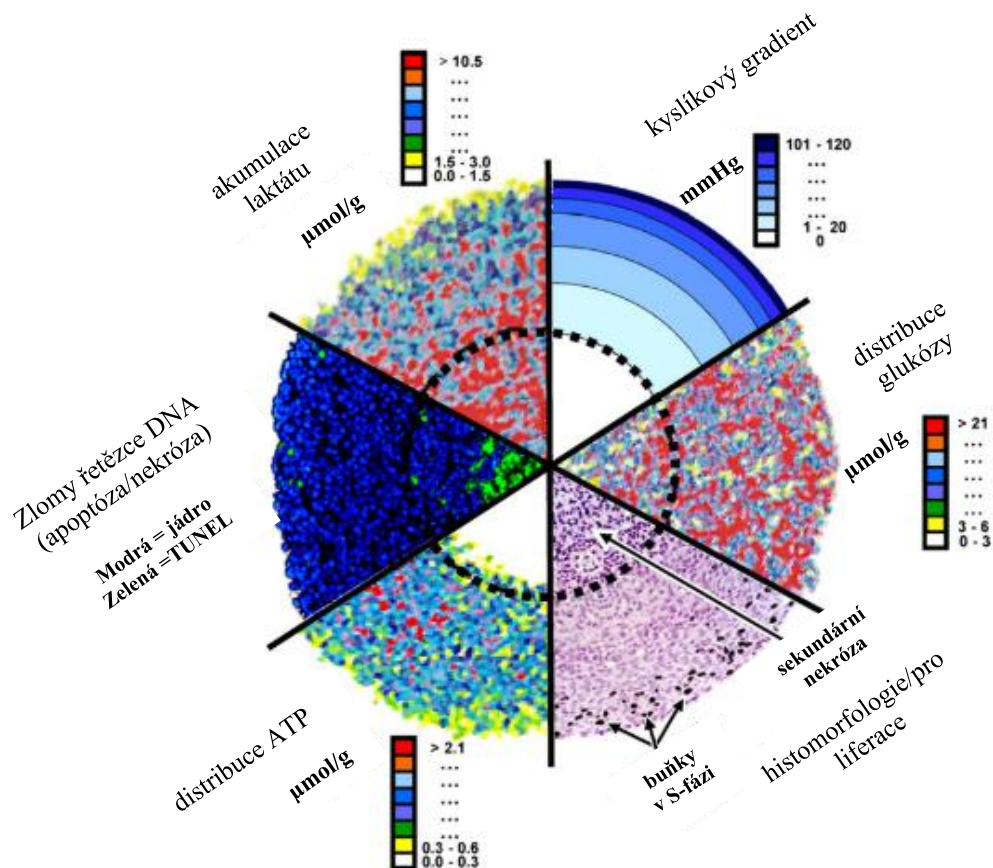
Dalším aspektem pro charakterizaci sféroidu je počet sféroidů v jedné jamce. Pro vysokokapacitní screening (HTS) se používá 96-jamková destička s jedním sféroidem na jamku. Při testech dlouhodobé kinetiky lze v jamce pěstovat 2–4 sféroidy, ale je nutné korigovat data pro interakci mezi sféroidy (Wu et al., 2017)

Excentricita sféroidu je geometrický parametr, který kvantifikuje odchylku od ideálního kulovitěho tvaru. Hodnota excentricity menší než 0,2 indikuje vysokou kulovitost a svědčí o rovnoměrné distribuci živin i metabolitů, což je zásadní pro redukovatelnost výsledků. Analýza se provádí na mikroskopických snímcích sféroidu pomocí softwarových nástrojů, přičemž se vyhodnocují kontury a plocha projekce. Kulovitost sféroidů přímo ovlivňuje účinnost difúze a akumulaci léčiv v různých částech 3D kultury. Vysoká excentricita může naznačovat mechanické poškození, nehomogenní růst nebo přítomnost více buněčných agregátů spojených do jednoho útvaru, což snižuje validitu experimentálních výsledků (Vitacolonna et al., 2024).

V neposlední řadě je velmi důležitým aspektem vnitřní organizace sféroidu. Ideální sféroidy vykazují zonální uspořádání, které reflektují přirozenou architekturu nádorové tkáně (Mitrakas et al., 2023). Zevní vrstvu tvoří proliferující buňky exprimující marker

Ki-67, což svědčí o aktivním buněčném dělení (Däster et al., 2017). V této vrstvě je nejvyšší dostupnost kyslíku a živin, které podporují růst a metabolickou aktivitu. Střední vrstvu sféroиду tvoří diferencované buňky, které již neproliferují, ale zachovávají funkční fenotyp a tvoří přechod mezi aktivním povrchem a centrem sféroidu (Mitrakas et al., 2023). V centrální části se pak běžně objevuje hypoxická až nekrotická oblast, kde jsou detekovatelné molekulární markery jako hypoxií indukovaný faktor 1 alfa (HIF-1 α), protein 53 (p53) a aktivovaná kaspáza-3 (Däster et al., 2017). Tyto ukazatele odrážejí buď adaptaci na stres nebo probíhající apoptózu v důsledku nedostatku kyslíku (Däster et al., 2017; Zhang et al., 2021). Identifikace jednotlivých zón se provádí imunohistochemicky a kvantifikují pomocí softwarové analýzy obrazu (Piccinini, 2015). V některých studiích byly navíc tyto strukturální vrstvy kolerovány s distribucí léčiv ve sféroidu, čímž bylo prokázáno, že farmakodynamika závisí na hloubce penetrace do jednotlivých vrstev (Däster et al., 2017; Tchoryk et al., 2019).

Na obrázku 4 jsou znázorněny různé aspekty charakterizace sféroidů.



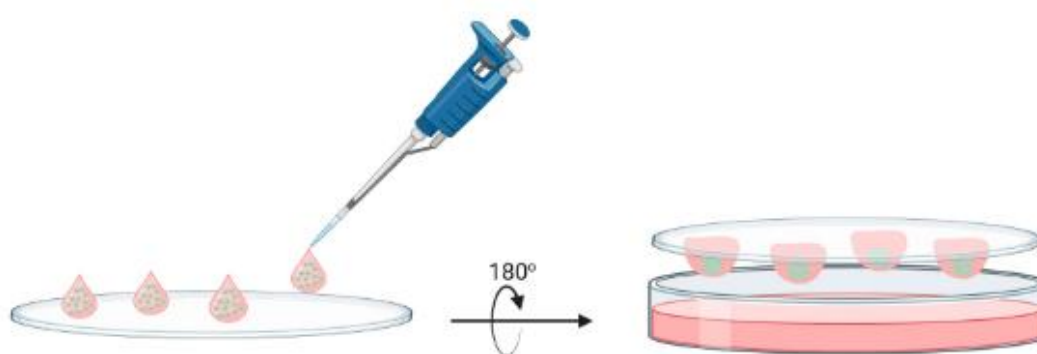
Obrázek 4: Charakterizace sféroidů; ATP = adenosintrifosfát; TUNEL = značení konců přerušovaných řetězců DNA pomocí dUTP a terminální deoxynukleotidyltransferázy, převzato z (Hirschhaeuser et al., 2010)

2.2 Metody přípravy sféroidů

Sféroidy lze připravit množstvím metod, které využívají buď jen buněčnou adhezi a gravitaci, nebo podpůrné nosiče, popřípadě sofistikovaná zařízení, například mikrofluidní čipy, či fyzikální principy, jako je magnetické nebo akustické pole. Níže jsou popsány hlavní přístupy, jejich principy, technické provedení, výhody a nevýhody.

2.2.1 Kultivace metodou visící kapky

Při metodě visící kapky (*hanging drop*) se na vnitřní stranu víčka Petriho misky pipetují malé kapky, o objemu přibližně 20–50 μl , buněčné suspenze. Pak se víčko převrátí nad misku s PBS a kapky visí díky povrchovému napětí (Obr. 5). Buňky v kapce se vlivem gravitace sdružují na spodní straně kapky a během 24–48 hodin vytvářejí jediný homogenní sféroid (Pinto et al., 2020). Tento způsob nevyžaduje žádné speciální vybavení (Foty, 2011), je relativně levný a umožňuje snadnou kontrolu počtu i složení buněk v každé kapce a tedy i velikost sféroidu.



Obrázek 5: Schéma metody visící kapky, převzato z (Mitrakas et al., 2023)

Za výhody této metody můžeme označit jednoduchost aparatury, snadná kontrola buněčného složení v kapce a nízké náklady (Foty, 2011; Pinto et al., 2020). Mezi nevýhody patří pracnost, pokud je třeba většího počtu kapek, může být ruční pipetování náročné. Dále je zde riziko odpařování kapalin, což vede k nutnosti udržovat v misce vlhkost a časté výměny média. Také může docházet k heterogenitě velikosti sféroidů mezi kapkami a k obtížnějšímu odběru sféroidu pro další analýzu. V současnosti už jsou ale v literatuře popsána možná vylepšení, jako tisk 3D držáků nebo mikrofluidické verze, které tyto nedostatky omezují (Pinto et al., 2020).

2.2.2 Agitační a rotační kultivace

Agitační a rotační metody udržují buňky v suspenzi pohybem kapaliny. V agitační baňce s míchadlem (*spinner flask*) je suspenze s buňkami neustále promíchávaná magnetickým míchadlem, což znemožňuje usazení buněk na stěnách a podporuje jejich vzájemné srážky a sdružování (Gupta et al., 2016). Na podobném principu funguje i rotační bioreaktor (*rotating wall vessel*, RWV), který simuluje mikrogravitaci tím, že nádobu s buněčnou suspenzí velmi pomalu otáčí kolem horizontální osy, takže buňky „plavou“ ve střední vrstvě kapaliny a neadherují (Obr. 6) (Steinwerth et al., 2024). Obě tyto metody vedou ke tvorbě sféroidu v kapalně fázi.



Obrázek 6: Schéma agitační a rotační metody, převzato z (Pinto et al., 2020)

Výhodou je možnost generovat velké množství sféroidů současně s dostatečným přílivem živin díky neustálému míchání. Dále je možné těmito metodami možné tvořit více štěpných kultur najednou, což je vhodné pro výrobu sféroidů ve větším měřítku. Mezi nevýhody patří citlivost na smykové napětí. Při vyšší rychlosti, může míchání poškodit buňky. Pomalejší agitace zase nemusí zabránit fragmentaci nebo nerovnoměrnému růstu sféroidů. Další nevýhodou může být, že tvorba sféroidů trvá 3–7 dní a velikost agregátů bývá heterogenní. Co se týče vybavení, je vyžadováno speciální skleněné nebo plastové nádoby, což je agitační baňka s míchadlem nebo RWV aparatura, a také je nutná kontrola rychlosti míchání (Pinto et al., 2020).

2.2.3 Kultivace na nepřilnavých površích s překrytím kapalinou

Principem této metody je, že destičky s nepřilnavými povrchy neboli *ultra-low-attachment* (ULA) desky, mají povrch modifikovaný tak, že buňky na něm nemají adhezivní místa (Pinto et al., 2020). Podobný princip má i metoda překrytím kapalinou neboli *liquid overlay*, kdy se povrch kultivační kultury překryje tenkou vrstvou agarózy. U této metody je obecně výhodou, že jsme díky ní schopni kultivovat velké množství sféroidů v multi-destičkách, ať už 96- nebo 384-jamkových.

Buněčná suspenze se asepticky nanese do jamek nebo misek vyráběných ve dvou základních variantách podle tvaru dna: plochém (*flat-bottom*) a konkávní (*u-bottom*) (Abuwatfa et al., 2024).

U plochého dna je jamka vybavena hladkým nepřilnavým povlakem z poly(HEMA)¹ nebo agarózy, díky čemuž buňky nepřisedají na rovný povrch dna, ale spontánně se sdružují do sféroidů (Abuwatfa et al., 2024). Tento formát umožňuje přímou spodní mikroskopii (Wissing et al., 2019) a snadné doplňování média. Avšak sféroidy vytvářené na plochém dně mají často širší a méně kompaktní tvar s vyšší variabilitou rozměrů mezi jamkami (Pinto et al., 2020).

Naopak *u-bottom* destičky mají jamky s konkávním dnem, které vlivem gravitace soustřeďují buňky do nejhlubšího bodu prohlubně, čímž vzniká v každé jamce jeden pravidelnější kulovitý sféroid (Obr. 7) (Din et al., 2024; Wissing et al., 2019). Díky tomuto designu se počet buněk vždy kumuluje ve střední části jamky, což zajišťuje vysokou reprodukovatelnost velikosti i tvaru sféroidů, a je proto preferován zejména ve vysokoprůtokovém screeningu cytotoxických látek (Din et al., 2024). Nevýhodou formátu *u-bottom* je komplikace při vizualizaci spodní polokoule sféroidu. Často je nutné použít otočný adaptér mikroskopu nebo jiné pomůcky, aby bylo dosaženo adekvátního zobrazení (Wissing et al., 2019).



Obrázek 7: Schéma U-bottom jamky, převzato z (Mitrakas et al., 2023)

V praxi se pro testování například protinádorových sloučenin a analýzu viability buněk používají *u-bottom* destičky. Na začátku nasazuje cca 2 000 buněk na jamku, ze kterých se přibližně do dvou dnů zformuje v každé jamce jeden sféroid o průměru 150–200 μm s minimálním rozptylem velikostí, což je klíčové pro srovnatelné a statisticky významné výsledky (Foty, 2011; Pinto et al., 2020). Naopak destičky

¹ poly(hydroxyethylmethakrylát)

s plochým dnem se uplatňují v pilotních studiích a vizualizaci živých buněk, kdy je důležité sledovat například interakce buněk s médiem (Abuwatfa et al., 2024; Wissing et al., 2019).

2.2.4 Scaffold-based přístupy kultivace

Scaffold-based metody využívají podpůrné nosiče, které napodobují ECM. Cílem je umožnit buňkám kontakty nejen vzájemné, ale i s touto strukturou, podporující diferenciaci a proliferaci. Pod tyto podpůrné struktury řadíme hydrogely, porézní nosiče nebo decelularizované ECM (dECM) (Abuwatfa et al., 2024).

Hydrogely jsou třírozměrná polymerní sítě schopné vázat a zadržet velké množství vody. Struktura hydrogelu vzniká chemickým nebo fyzikálním síťováním polymerních řetězců, což umožňuje materiálu bobtnat, ale zachovat souvislou formu. Díky vysokému obsahu vody a měkké struktuře hydrogely připomínají přírodní extracelulární matrix a jsou obecně vysoce biokompatibilní (Choi et al., 2024; Kaliaraj et al., 2023). Jsou propustné pro živiny, růstové faktory i signální molekuly, čímž podporují buněčný růst a diferenciaci. Hydrogely můžeme dle materiálu dělit na přírodní a syntetické. Mezi přírodní materiály řadíme alginát, kolagen, želatina, fibrin, hyaluronan a Matrigel a mezi syntetické zase PEG, RADA16 a PVA (Kaliaraj et al., 2023). Přírodní hydrogely jsou velmi dobře biokompatibilní, zatímco syntetické lze snadno chemicky modifikovat pro speciální aplikace. Hlavní výhodou hydrogelů je tedy podpůrné prostředí pro buňky a možnost nastavitelných mechanických vlastností. Nevýhodou je nižší mechanická pevnost, obtížnější manipulace a někdy obtížná sterilizovatelnost (Diez-Pascual, 2017). Další nevýhodou je nutnost přípravy a gelace, protože některé hydrogely vyžadují UV záření, enzymy nebo chemická činidla (Abuwatfa et al., 2024; Yoo et al., 2025).

Porézní nosiče jsou pevné 3D struktury s otevřenými póry a patří sem například polymetrické pěny nebo mikropolymerové nosiče. Buňky se na povrchu či uvnitř pórů mohou uchytit a vytvářet trojrozměrné modely. Výhodou je fyzická pevnost nosiče a dobrá cirkulace živin v makropórech. Nevýhodou může být difúzní omezení v hlubších částech nosiče a obtížnější analýzy *in situ*. Přístupy s porézními nosiči se často kombinují s bioreaktory (Abuwatfa et al., 2024; Pinto et al., 2020).

Decelularizované ECM jsou struktury z čerstvě izolované tkáně, které se chemicky očistí od buněk, aby zůstala pouze proteinová síť. Ta se může přetvořit na gel nebo ponechat

v původním tvaru pro kultivaci sféroidů buď na povrchu, nebo ve speciálních mikrosystémech. Decalularizovaný materiál obsahuje bohatý mix ECM proteinů a růstových faktorů, ale příprava je náročná (Costa et al., 2016; Ferreira et al., 2021).

Celkovou výhodou *scaffold-based* kultivace je, že buňky vytvářejí bohaté interakce mezi buňkami a matrix, což vede k větší biologické funkčnosti. Nevýhodou je větší složitost protokolu, případné nepředvídatelné složení přírodních materiálů a možné riziko tvorby nerozpustných oblastí v rozsáhlých gelech (Yoo et al., 2025).

2.2.5 Kultivace pomocí mikrofluidních systémů

Mikrofluidní platformy využívají řízené proudění kapalin v mikroskopických kanálcích k tvorbě a kultivaci sféroidů. Dvěma hlavními přístupy jsou *droplet-based* mikrofluidika a *organ-on-chip* neboli tkáňové čipy.

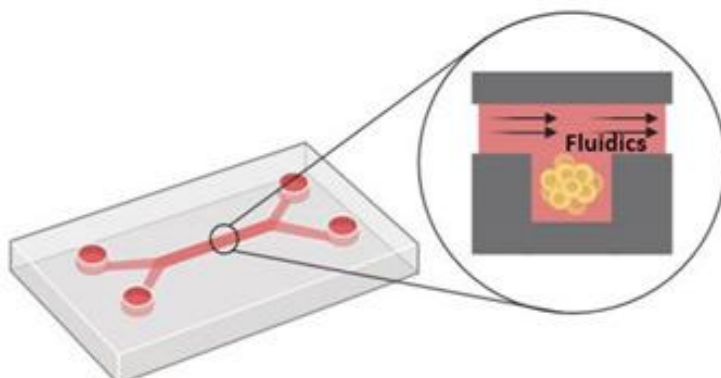
Droplet-based mikrofluidika spočívá v tom, že se buněčná suspenze rozčlení na tisíce až miliony drobných kapiček (Obr. 8), v rozsahu pikolitrů až nanolitrů, uvnitř mikrofluidického čipu, kde je vodní fáze rozptýlena v nosném oleji nebo jiné nepolární fázi. Každá kapka pak funguje jako samostatný „mikrotank“, ve kterém buňky vytvářejí sféroidní shluky, přičemž jejich velikost i počet lze velmi přesně řídit úpravou průtokových rychlostí, geometrií kanálek či použitím hydrodynamických pastí a surfaktantů (Chauhdari et al., 2025; Papamichail et al., 2025; Pinto et al., 2020). Například Panuška et al. (2024) demonstrovali, že díky použití OSTE+ polymeru lze v takovém čipu během 24 hodin získat vysoce homogenní sféroidy buněk MCF-7 a U87 (Panuska et al., 2024).



Obrázek 8: *Droplet-based* mikrofluidika, převzato z (Hirschhaeuser et al., 2010)

Hlavní přednosti této metody zahrnují extrémně vysoký průtok, až stovky tisíc kapek za minutu, nízkou spotřebu médií a reagensií a možnost paralelního screeningu velkého množství vzorků. Naopak nevýhodou je nutnost specializovaných olejových médií, surfaktantů a přesného mikrofluidického vybavení, což zvyšuje komplexnost a cenu experimentu. *Droplet-based* platformy jsou proto ideální pro vysokokapacitní testování protinádorových látek i pro modelování tubulárních orgánů v mikroměřítku (Abuwatfa et al., 2024; Panuska et al., 2024).

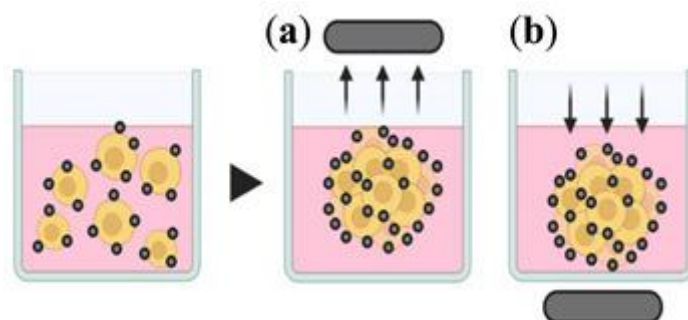
Organ-on-chip přístup, který integruje 3D buněčnou kulturu do mikrofluidických čipů simulujících určité orgánové prostředí. Platformy typu mikrokanály umožňují realistickou perfuzi a mechanické stimuly jako například napínání tkáně (Obr. 9). Tyto systémy zpravidla kombinují kultivaci ve 3D matici s přítomností endotelových vrstev. Výhodou je realistický model *in vivo* podmínek, ale nevýhodou je složitá výroba a validace zařízení. Mikrofluidické *organ-on-chip* se používají pro modely plic, jater, ledvin, srdce apod., často s využitím buněk lidského původu pro detailní analýzy farmakokinetiky a toxikologie. (Clarke et al., 2021; Velasco et al., 2020)



Obrázek 9: Schéma mikrofluidní platformy, převzato z (Pinto et al., 2020)

2.2.6 Kultivace metodou magnetické a akustické levitace

Metoda magnetické levitace využívá magnetických nanopolyelementů, které buňky absorbují nebo vážou na svůj povrch. Poté se kultivační nádoba umístí nad nebo pod permanentní magnet. Buňky jsou pak magneticky přitahovány k rozhraní vzduch-kultura a tam se formují do 3D útvaru (Obr. 10) (Souza et al., 2010; Tepe et al., 2023). Příprava zahrnuje inkubaci buněk s tzv. „*nanoshuttle*“ reagensií obsahující nanočástice Fe_3O_4 a Au a adhezivní peptid (Souza et al., 2010). Sféroïd vzniká během hodin až jednoho dne po přiložení magnetického pole (Pinto et al., 2020).



Obrázek 10: Schéma metody magnetické levitace, převzato z (Pinto et al., 2020)

Výhodou je rychlá tvorba sféroidu bez tuhé matrice a možnost ovlivňovat jeho tvar i prostorové uspořádání, takže pomocí magnetického pole lze ovládat pozici nebo i vzájemné uspořádání více typů buněk (Souza et al., 2010). Magnetická metoda umožňuje snadnou heterotypní kultivaci, například nádorové buňky s fibroblasty v definované konfiguraci (Urbanczyk et al., 2020). Nevýhodou je nutnost magnetických nanomateriálů, jejichž toxicita a vliv na genovou expresi se ještě zkoumá, a omezená velikost sféroidů – počet buněk je omezen magnetickou silou (Souza et al., 2010; Urbanczyk et al., 2020).

Oproti tomu akustická metoda využívá stojaté ultrazvukové pole v kapalině k vytvoření tlakových uzlů, v nichž buňky bezkontaktně agregují do sféroidů. Technicky jde o umístění buněčné suspenze do malé komůrky s ultrazvukovými měniči tak, že se buňky zachytávají do akustických „minipastí“. Podle novějších studií je akustická levitace vysoce biologicky šetrná, tedy umožňuje udržet delší kultivaci a spontánní samoorganizaci buněk (Rabiet et al., 2024).

Výhodou akustiky je čistě bezkontaktní prostředí. Buňky nejsou v žádném kontaktu s materiálem, což snižuje artefakty ze stěn kultivační misky. Dále lze kontrolovat formování sféroidů změnou frekvence a intenzity zvuku. Nevýhoda spočívá v technické náročnosti, hlavně specializované ultrazvukové přístroje, a potenciálním ohřevu suspenze. Metoda je vhodná pro citlivé buňky či pro studium migrace a invaze buněk bez podporující matrice (Rabiet et al., 2024).

2.2.7 Kultivace metodou SHIBS

SHIBS neboli *spheroid-hydrogel integrated biomimetic system* je inovativní hybridní systém, který kombinuje již formované sféroidy s hydrogelovým nosičem. Postupně se nejprve vytvoří sféroid, například klasickou *scaffold-free* metodou, a poté se buňky či celé sféroidy enkapsulují do hydrogelové matrice. Tímto způsobem lze současně

zachovat silné buněčné interakce typické pro sféroid a zároveň poskytnout 3D hyaluronanovou/elastickou oporu podobnou *in vivo*. (Yoo et al., 2025)

Výhody SHIBS spočívají v modelování složitějšího prostředí, například nádor v okolní ECM, a často v lepších fyziologických odpovědích. Hlavní nevýhody jsou obtížnější reprodukovatelnost, nutnost optimalizace gelace hydrogelu se sféroidy a složitější mikroskopie. Přesto je metoda SHIBS považovaná za perspektivní koncept pro budoucí rozvoj biomimetických modelů (Yoo et al., 2025).

2.2.8 Kultivace pomocí mikrokavitního pole

Mikrokavitní (mikrojamkové) systémy jsou předformované destičky z polydimethylsiloxanu (PDMS), skla nebo plastu, obsahující pravidelnou mřížku malých dutinek neboli mikrojamek, které mají obvykle stěny o rozměrech 100–150 μm . Do každé dutinky se pipetuje definovaný počet buněk, které tam v uzavřeném prostoru utvoří sférický shluk. Polymery či síťovaná membrána, například nylonová mřížka v „*microwell-mesh*“, pak udržují sféroid uvnitř jamky (Mosaad et al., 2018).

Tato metoda umožňuje vysokopropustnou produkci velmi rovnoměrných sféroidů – typicky se připraví stovky až tisíce jednotek na jedné destičce. Výhodou je vysoká standardizace a kompatibilita s automatizovanými postupy. Nevýhodou jsou náklady na výrobu specializovaných desek a fakt, že v každé jamce vyroste pouze jeden sféroid. Typické buňky pro takové čipy jsou nádorové linie nebo kmenové buňky.

2.2.9 Kultivace na mikronosičích (*microcarrier-based* kultivace)

Mikronosiče jsou malé sférické nosiče, například polymery Cytodex-3 z dextranu, plastové či keramické částice, s povrchem umožňujícím přichycení adherentních buněk. Buňky se na tyto nosiče navážou a poté, vlivem shlukování nosičů s buňkami, vznikají volně se vznášející sféroidy (Pinto et al., 2020). Tato metoda se používá hlavně v bioreaktorech pro rozsáhlou kultivaci adherentních buněk a průmyslové pěstování pro produkci proteinů.

Hlavní výhody jsou rychlost a jednoduchost. Již existující buňky prostě navážeme na nosiče a do 1–2 dnů získáme homogenní agregáty. Můžeme snadno řídit počet nosičů a počet buněk/částic pro kontrolu velikosti sféroidu. Také umožňuje ko-kultivaci různých buněčných typů na stejných nosičích. Mezi nevýhody patří to, že přítomnost umělých

částic snižuje fyziologickou věrnost modelu. Navíc nelze snadno zbavit sféroidy nosičů pro některé analýzy (Pinto et al., 2020; Simao et al., 2023).

2.3 Hodnocení viability a metabolické aktivity sféroidů

Ve 3D buněčných kulturách je klíčové ověřit životaschopnost (viability) a metabolickou aktivitu buněk. Z řady pokročilých bioanalytických metod se nejčastěji využívá kvantifikace intracelulárního adenosintrifosfátovým (ATP) luminiscenčním testem, například CellTiter-Glo[®] 3D, protože poskytuje velmi citlivé a rychlé hodnocení viability (Kijanska et al., 2016; Riss et al., 2016). Vzhledem k neprůhlednosti 3D buněčných struktur jsou pak pro toto prostředí vhodné zejména biochemické testy, u kterých nehraje roli difúze barviv. Naproti tomu tradiční barvicí metody založené na redukci tetrazoliových solí mitochondriálními dehydrogenázami (MTT², WST-1³) nebo na redukci resazurinu (Alamar Blue), ztrácejí svou spolehlivost ve sféroidech (Cox et al., 2021; Kijanska et al., 2016). Důvodem je omezená difúze substrátu a akumulace produktu uvnitř 3D agregátů, což může vést ke zkreslení výsledků a nízké reprodukovatelnosti. Proto se často doporučuje upřednostnit luminiscenční ATP testy nebo jiné metody nezávislé na průchodu činidel celou strukturou.

2.3.1 Stanovení dehydrogenázové aktivity

Tetrazoliové soli, jako jsou MTT nebo WST-1, měří aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk konverzí bezbarvé tetrazoliové soli na barevný formazan. Tento princip je tradičně používán pro stanovení počtu životaschopných buněk. V 3D sféroidových kulturách však bývá problém, že substrát (tetrazolium) nepronikne rovnoměrně do nitra sféroиду, a vzniklý formazan může zůstat lokalizován na povrchu nebo v omezené vrstvě buněk (Kijanska et al., 2016). Studie dokládají, že u mikrostruktur byly tetrazoliové soli, včetně MTS a resazurinových testů, vyřazeny jako nevhodné kvůli omezené pronikavosti činidla (Cox et al., 2021; Kijanska et al., 2016). Praxe tak často ukazuje, že tyto testy podhodnocují skutečnou viability či dávají nejednoznačné výsledky ve srovnání s ATP testy, a proto se pro hodnocení sféroidů nevyužívají jako primární metoda.

² 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid

³ 4-[3-(4-iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen

2.3.2 Stanovení množství ATP

Luminiscenční test založený na stanovení ATP pomocí enzymatické reakce luciferinu a luciferázy jsou v 3D kultuře vysoce výhodné. Tyto testy lyzují buňky tvořící sféroid a měří přímo koncentraci ATP, která zde slouží jako biomarker životaschopných buněk (Kijanska et al., 2016). Výhodou je rychlý průběh bez nutnosti delší inkubace s buňkami, vysoká citlivost a minimální artefakty (Riss et al., 2016). ATP testy byly speciálně optimalizovány pro 3D formáty a jsou rozšířitelné pro vysokopropustná měření (Kijanska et al., 2016; Riss et al., 2016). V literatuře je uváděno, že luminiscenční měření ATP je nejrychlejším a nejcitlivějším testem viability, méně náchylným na rušivé vlivy než barevné testy (Riss et al., 2016). Celková koncentrace ATP je přímo úměrná s počtem životaschopných buněk i ve 3D modelech a umožňuje spolehlivé porovnání viability mezi vzorky.

2.3.3 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy

Další bioanalytickou možností je měření uvolněného množství laktátdehydrogenázy (LDH) v kultivačním médiu, která slouží jako neinvazivní marker cytotoxicity. LDH je buněčný enzym uvolňovaný při narušení buněčné membrány, takže její aktivita v médiu odpovídá míře buněčné smrti. V kontextu sféroidů je tento test velmi praktický, protože nevyžaduje manipulaci s mateřským materiálem a není závislý na penetraci činidel do 3D struktury. Studie potvrzují, že LDH test umožňuje dlouhodobé sledování viability bez destrukce vzorku a jeho přesnost je srovnatelná s jinými metodami hodnocení množství buněk ve sféroidech (Cox et al., 2021). Výhodou tohoto testu je možnost měřit v podstatě libovolné množství buněk. Nevýhodou je, že je potřeba zohlednit pozadí, které tvoří LDH volných buněk, či omezená linearita při velmi hustých kulturách. Tato metodika je ale přesto považována za velmi užitečný doplněk k ATP testům.

2.4 Buněčné linie vhodné pro přípravu sféroidů

Pro tvorbu sféroidů se využívá široké spektrum buněk. Nejčastěji využívají dobře charakterizované nádorové buněčné linie, které mají schopnost spontánně agregovat a tolerovat 3D kulturu. V onkologickém výzkumu jsou používány různé nádorové buněčné linie. Mezi klasické patří buňky karcinomu prsu MCF-7, kolorektálního karcinomu HCT116, HT-29, Caco-2, karcinomu plic A549, vaječnicků SK-OV-3; melanomu A375 či glioblastomu U87 (Han et al., 2021; Chen et al., 2022; Papapostolou

et al., 2023). Pro modelování jaterních funkcí nebo toxikologie se používají hepatomové buňky HepG2 nebo HepaRG (Takahashi et al., 2015). V oblasti regenerativní medicíny se sféroidy tvoří z kmenových buněk MSC, iPSC nebo z embryonálních kmenových buněk (Choi et al., 2020). Pro tvorbu neuronových modelů se používají buňky neuroblastomu SH-SY5Y nebo primární kultury neuronů a astrocytů (Jung et al., 2013).

Linie HeLa, původně izolována z cervikálního adenokarcinomu, je pro tvorbu 3D sféroidů, díky své velikosti a rychlému růstu jedním z nejčastěji využívaných modelů (Crnogorac et al., 2021). Tyto buňky dokážou za 2–3 dny vytvořit kompaktní sféroidy jak pomocí metody visící kapky, tak na ULA površích, a to s minimálním mechanickým namáháním kultury. Díky své odolnosti vůči drobným smykovým silám a konzistentní schopnosti agregovat se do jednotlivých 3D útvarů slouží HeLa sféroidy často jako interní kontrola při validaci nových 3D kultivačních platforem nebo screeningových testech protinádorových sloučenin (Crnogorac et al., 2021; Pinto et al., 2020).

Linie MCF-7 pochází z luminálního typu karcinomu prsu a vyznačuje se silnou závislostí na estrogenu pro svůj růst. Ve 3D kultuře tato linie vytváří kompaktní sféroidy zejména na ULA površích či po enkapsulaci do hydrogelu, kde se zachovává strukturní integrita a fenotyp estrogenové závislosti (Guarnizo-Mendez et al., 2021). Díky tomu je MCF-7 považována za ideální model pro studium biologických dějů v estrogen-senzitivních nádorech prsu a pro testování hormonálně citlivých léčiv, kdy se měří například změny proliferace či apoptózy při modulaci estrogenových receptorů (Guarnizo-Mendez et al., 2021; Pinto et al., 2020).

Buňky linie A549, pocházející z plicního adenokarcinomu s alveolární charakteristikou vytvářejí ve 3D kultuře spíše volné agregáty, které je třeba nechat několik dní zrát, než dojde k jejich smrštění do kompaktních kulovitých sféroidů (Zanoni et al., 2016). Tato pomalejší kinetika formování je výhodná pro studium časově rozvržených buněčných procesů, jako je migrace, a proto se A549 často používají jako model plicních nádorů pro testování chemoterapeutik a analýzu permeability látek skrze méně kompaktní 3D struktury (Pinto et al., 2020; Zanoni et al., 2016).

Buněčná linie HepG2, původně odvozená z lidského hepatomu, si v 3D sféroidních kulturách udržuje některé klíčové jaterní funkce, zejména sekreci albuminu a aktivitu cytochromu P450, mnohem déle než v monovrstvách. HepG2 sféroidy vykazují zvýšenou metabolickou aktivitu a reprodukovatelné odpovědi na hepatotoxické látky, což je činí

standardním modelem pro předklinické testy hepatotoxicity, jelikož trojrozměrné prostředí lépe zachovává enzymatickou kapacitu (Hurrell et al., 2018; Pinto et al., 2020).

Lidská pankreatická adenokarcinomová linie Panc-1 tvoří ve 3D poněkud tužší a pomaleji se smršťující sféroidy, které často vyžadují ko-kultivaci s fibroblasty pro dosažení homogennějšího a více difúzního karcinomového modelu. Tento přístup umožňuje studium interakcí mezi nádorovými buňkami a stromálními komponentami, napodobuje desmoplastickou reakci, tedy typ proliferace vaziva vyvolaný invazivním růstem nádoru, charakteristickou pro pankreatický karcinom a zvyšuje relevanci modelu pro screening protinádorových sloučenin (Pinto et al., 2020; Ricci et al., 2025).

Linie Saos-2, odvozená od osteosarkomu, je cenná pro své schopnosti tvořit ve 3D velmi homogenní sféroidy na ULA površích. Tyto sféroidy mají pravidelný kulovitý tvar a konzistentní velikost, což usnadňuje kvantitativní hodnocení růstu, viability i efektivity anti-osteosarkomové terapie v *in vitro* modelech kostní tkáně (Kundu et al., 2019; Pinto et al., 2020).

2.5 Aplikace sféroidů

Sféroidy představují všestranný nástroj v oblasti biomedicínského výzkumu, vývoje léčiv a moderní medicíny. Díky své prostorové struktuře lépe napodobují *in vivo* podmínky a umožňují přesnější studium buněčných funkcí, interakcí a odpovědí na vnější podněty.

2.5.1 Onkologický výzkum a testování cytotoxických látek

V nádorovém výzkumu slouží sféroidy jako realistický model pevných nádorů, jelikož vytvářejí gradienty kyslíku, živin i metabolitů, a zachovávají buněčnou heterogenitu. To umožňuje testovat cytotoxické látky za podmínek, které více odpovídají situaci v těle. Například studie ukázaly, že 50% inhibiční koncentrace (IC_{50}) pro doxorubicin může být v 3D modelu až 18,8x vyšší než ve 2D kultuře, což svědčí o větší odolnosti a věrnějším modelování nádorového mikroprostředí (Jubelin et al., 2023).

2.5.2 Toxikologie a farmaceutický screening

Sféroidy z hepatomových a kardiomyocytárních buněk se hojně využívají k testování hepatotoxicity a kardiotoxicity nových léčiv. Díky tomu, že si buňky v 3D kultuře lépe zachovávají diferenciaci a metabolismus. Například HepG2 sféroidy vykazují stabilní aktivitu cytochromu P450 a umožňují dlouhodobé testy (Abuwatfa et al., 2024).

Vysokokapacitní screening sloučenin ve 3D formátu odhaluje nejen akutní cytotoxicitu, ale i dlouhodobé účinky, farmakokinetické profily a metabolické interakce, včetně detekce reaktivních metabolitů (Rodrigues et al., 2024).

2.5.3 Personalizovaná medicína

Sféroidy odvozené od patientských buněk (*patient-derived spheroids*; PDS) umožňují testovat účinnost léčiv v individuálním kontextu. Studie Hofmannové et al. (2022) prokázala, že sféroidy získané z nádorové tkáně patientek s karcinomem prsu věrně napodobují původní nádor a umožňují předpovědět odpověď na léčbu (Hofmann et al., 2022)

2.5.4 Imunologické aplikace

Sféroidní modely se často vkládají do kolagenních gelů nebo dECM pro studium invazivity a angiogeneze. Ko-kultivace s imunitními buňkami, například T-lymfocyty nebo makrofágy, napomáhá vytvoření komplexního modelu nádoru s možností sledování imunitní infiltrace. Hloubka infiltrace přitom závisí na poměru buněk a přísunu média (Kim et al., 2024)

3 Organoidy

Organoidy jsou 3D, samoorganizující se buněčné struktury, které vznikají *in vitro* z různých typů buněk (Chauhdari et al., 2025), včetně lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk, lidských embryonálních kmenových buněk, a dokonce i z patientských tkáňových biopsií. Organoidy úzce napodobují strukturu a funkci lidských orgánů, což umožňuje věrněji simulovat *in vivo* prostředí (Bai et al., 2024). Tyto systémy v současnosti významně přispívají ke studiu farmaceutického vývoje, patologických procesů a testování terapeutických přístupů. Tyto struktury ale nejsou skutečně funkčními orgány a je třeba na tuto skutečnost brát ohledy (Chauhdari et al., 2025).

První náznaky této technologie sahají až do počátku 20. století, kdy byl pojem organoid poprvé definován, ale skutečný průlom nastal až v roce 2009, kdy byly kultivovány první střevní organoidy (Bai et al., 2024). V rámci posledního desetiletí se oblast organoidů rychle rozvíjí a zahrnuje modely různých orgánů, jako jsou játra, ledviny, plíce, slinivka břišní, mozkové struktury, mléčné žlázy, vejcovody nebo hipokampus. V rámci zvířecí říše se například v roce 2020 podařilo kultivovat organoid jedové žlázy hadů (Bai et al., 2024).

V porovnání s tradičními 2D buněčnými kulturami, které nejsou schopny reprodukovat prostorovou organizaci tkání a buněčné interakce (Chauhdari et al., 2025), organoidy umožňují mnohem realističtější simulaci biologických procesů. Toho lze využít především v onkologickém výzkumu, kde se organoidy snaží věrně napodobit nádorové mikroprostředí a odpovědi na protinádorová léčiva. Organoidy se proto staly cennými modely pro testování nových terapií (Zhou et al., 2025). Dále jsou hojně využívány jako nástroj pro lepší pochopení mechanismů nemocí, jako jsou rakovina, neurodegenerativní choroby (Venkataraman et al., 2020) nebo genetické poruchy (Baldassari et al., 2020).

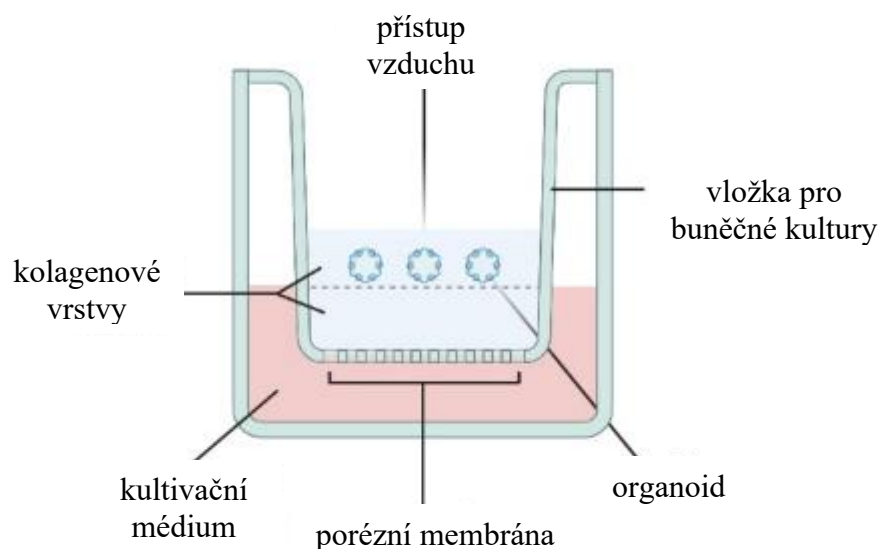
3.1 Metody přípravy organoidů

Konstrukce organoidů je složitý proces, který čelí řadě výzev. Mezi hlavní faktory ovlivňující úspěch jejich pěstování patří volba vhodného materiálu pro buněčnou kultivaci, optimální růstové faktory a podmínky kultivace. Pro jejich přípravu se v literatuře nejčastěji využívají základní techniky, jež sdílí principy s tvorbou sféroidů,

a dále řada specifických metod, umožňujících vznik komplexních 3D struktur připomínajících autentičtější mikroprostředí *in vivo*.

Obecné přístupy zahrnují kultivaci v ULA jamkách či visící kapky, které usnadňují shlukování buněk do jednotlivých agregátů. Dále se využívá zakotvení v gelových maticích, například v Matrigelu, kde buňky mohou vytvářet dutiny a struktury podobné tkáni. Taky kultivace *organ-on-chip* je metoda, která se používá i pro tyto struktury. A v neposlední řadě se pro tvoření větších organoidů používá metoda s bioreaktory.

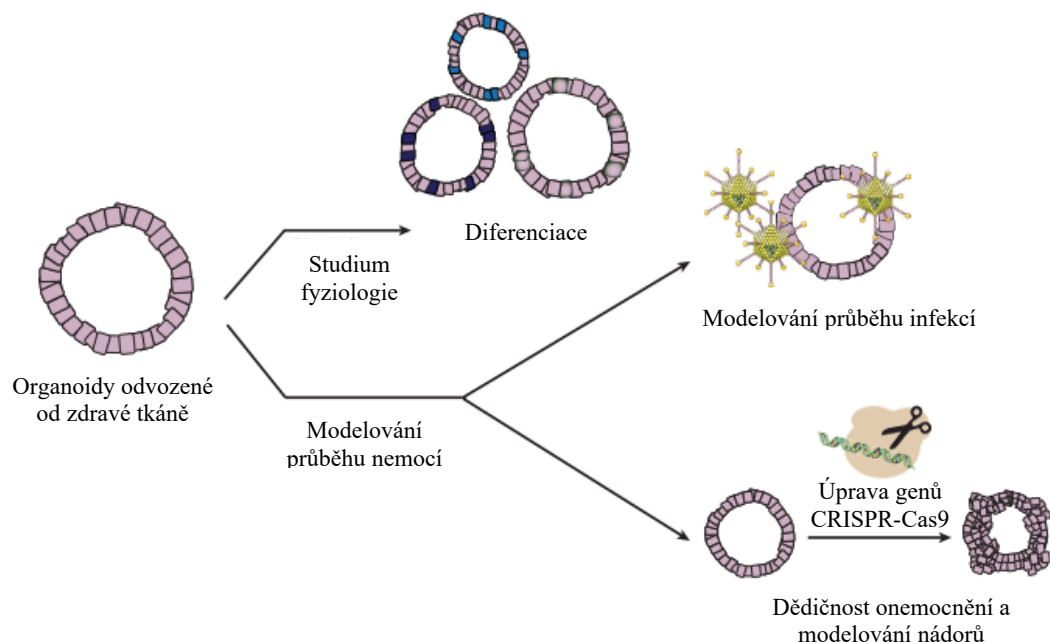
Máme ale i metody, které se přednostně používají pro organoidy. Jednou s těchto metod je rozhraní vzduch-médium neboli *air-liquid interface* (ALI) (Obr. 11). ALI kultura simuluje vnější povrch orgánů, například sliznici dýchacích cest či střeva. Buňky nebo fragmenty tkání se umístí na průsvitný nosič, třeba *transwell* membránu tak, aby spodní plocha zůstala ponořená v živném médiu a horní část vystavena vzduchu. Sampaziotis et al. (2021) dokázali, že cholangiocyty v ALI organoidech vytvořily kanálkovou strukturu s autentickou polaritou a transportními funkcemi žlučových buněk (Sampaziotis et al., 2021). Dále tu je metoda zvaná Asembloid. Asembloidy vznikají fúzí dvou a více předpěstovaných organoidů, například mozkového a talamického, což umožňuje studium interregionálních interakcí. Kim et al. (2025) popsali tvorbu cerebrálně-retinálních asembloidů, které rekapitulují migraci neuronů z primární mozkové oblasti do sítnice (Kim et al., 2025).



Obrázek 11: Schéma *air-liquid interface* (ALI), převzato z (Gunti et al., 2021)

3.2 Aplikace organoidů

Na obrázku 12 je vyobrazeno obecné schéma pro aplikace organoidů odvozených od zdravé tkáně.



Obrázek 12: Aplikace organoidů odvozených z fyziologických buněk; CRISPR = shluky pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv; Cas9 = kaspáza 9, převzato z (Frandsen, 2022; Schutgens et al., 2020)

3.2.1 Střevní (gastrointestinální) organoidy

Střevní organoidy, odvozené z dospělých či pluripotentních kmenových buněk střevní sliznice, modelují komplexní morfologii střevní sliznice a tím umožňují relativně věrně replikovat patologii střevních onemocnění (Sato et al., 2009; Tian et al., 2023). Mezi ně patří genetická onemocnění jako například cystická fibróza (Schwank et al., 2013), dále sem patří infekční gastroenteritidy či zánětlivá onemocnění střev (Boj et al., 2017). Preklinické studie ukazují, že na střevních organoidech můžeme rekonstruovat projevy infekčních a dědičných onemocnění střev a sloužit jako pacientské modely s vysokou mírou spolehlivosti (Sato et al., 2009; Vlachogiannis et al., 2018). V klinických studiích byly pacientské střevní organoidy úspěšně použity pro testování transmembránových regulátorů vodivosti cystické fibrózy (CFTR), v tzv. inovační klinická studie pro cystickou fibrózu (HIT-CF) (Soto-Gamez et al., 2024), či pro predikci odpovědi na léčbu nádorů gastrointestinálního traktu (Sailer et al., 2017; Zhou et al., 2021). Organoidové kultury jsou také využívány pro screening nových léčiv

i stravovacích nebo farmakokinetických vlivů na sliznici střev (Zeng et al., 2024; Zhou et al., 2021).

3.2.2 Mozkové (cerebrální) organoidy

Mozkové organoidy vznikají z lidských embryonálních nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk a dokážou se samovolně diferencovat do specifických struktur připomínající části mozku (Lancaster et al., 2013; Quadrato et al., 2017). Tyto organoidy umožňují sledovat průběh časově řízeného vývoje mozku *in vitro* a modelovat neurologické poruchy od mikrocefalie až po neurodegenerativní choroby jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova nemoc (Krenn et al., 2021; Lancaster et al., 2013). Používají se také k výzkumu mozkových nádorů a gliomů. Například kultivace nádorových kmenů v mozkových organoidech věrně napodobuje invazivní růst glioblastomu (Wang et al., 2022; Wensink et al., 2021). Mozkové organoidy se doplňují technikami *imunostaining* a *single-cell* sekvenování, které detailně mapují buněčné typy a genovou expresi (Quadrato et al., 2017; Sato et al., 2011).

Mozkové organoidy slouží jako efektivní preklinická platforma pro testování a navrhování personalizované léčby u neurologických onemocnění. Umožňují například testovat terapie inhibice konkrétních signálních drah či genovou editací, například shluky pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPR) (Rossi et al., 2018) v lidském mozkovém kontextu. Výzkumné skupiny, již ukázaly využití organoidů k reprodukci průběhu Alzheimerovy choroby či k identifikaci cílových drah pro léčbu například změny β -amyloidu (Krenn et al., 2021).

3.2.3 Jaterní organoidy

Jaterní organoidy se tvoří z jaterních kmenových buněk, hepatocytů i diferenciovaných jaterních buněk, které v 3D podpoře matrigelu vytvářejí struktury připomínající tkáň jater (Broutier et al., 2017; Huch et al., 2013). Takto vzniklé organoidy věrně replikují architekturu jaterních buněk a interakcí buňka-extracelulární matrix. Jaterní organoidy umožňují studium řady chorob: genetických jaterních poruch, nemocí s akumulací tuku, alkoholické jaterní nemoci, virových hepatitid i nádorů jater (Broutier et al., 2017; Fatehullah et al., 2016; Zhao et al., 2022). Slouží k odhalení patofyziologických mechanismů, například mutace v genech pro metabolismus jater, a významně přispívají k testování hepatotoxických účinků léků a chemických látek (Boj et al., 2017; Broutier et

al., 2017). Díky množitelnosti těchto modelů se dají použít i jako individualizované modely, kde se testuje odpověď na léky či regenerativní léčba u konkrétního pacienta.

3.2.4 Organoidy dýchacích cest

Organoidy dýchacích cest zahrnují modely epitelu horních i dolních cest dýchacích. Tyto kultury zahrnují všechny hlavní typy buněk respiračního epitelu: řasinkové buňky, Clarovy buňky, pohárkové buňky, bazální buňky i alveolární pneumocyty typu I i II (Barkauskas et al., 2017; Bosáková et al., 2022). Díky tomu jsou považovány za vysoce fyziologicky relevantní modely pro studium respiračních onemocnění (Li et al., 2023). V posledních letech se tyto organoidy uplatňovaly zejména ve výzkumu virových infekcí například chřipky, lidského respiračního syncytiálního viru (RSV) nebo SARS-CoV-2, kdy odhalily nové poznatky o patogenezi, věku závislé citlivost a imunitních mechanismech infekce. Vývoj kultivace „*apical-out airway*“ organoidů umožňuje nasimulovat dýchací funkce v uzavřeném prostředí. Tyto modely se také využívají pro testování inhalovaných léků, vakcín a ve studiích rizika zoonotických virů (Barkauskas et al., 2017; Sachs et al., 2019).

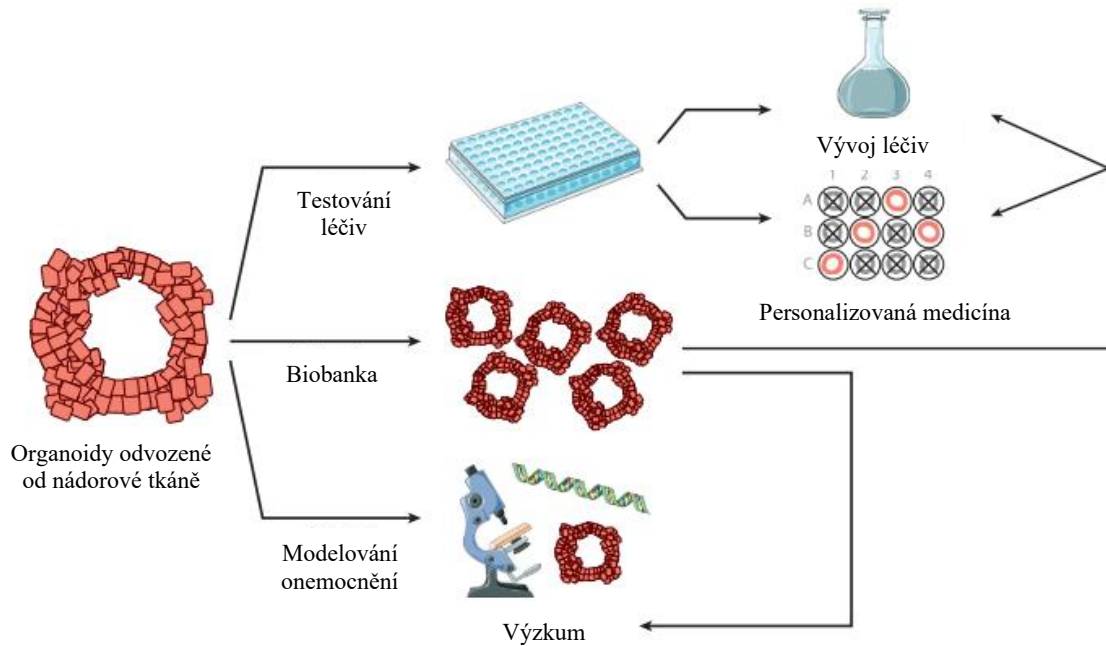
Vedle infekčních modelů se plicní organoidy používají k výzkumu chronických onemocnění plic jako je bronchiální astma, chronická obstrukční plicní nemoc nebo plicní fibróza, a při testování nových terapeutik. Výzkumy se také kombinují s imunitními buňkami, hlavně makrofágy a T-lymfocyty, aby studovali zánětlivou odpověď a nádorové mikroprostředí plic, čímž vzniká pokročilý model odpovídající lidským plicím.

3.2.5 Nádorové organoidy a personalizovaná medicína

Organoidy lze pěstovat i přímo z nádorových buněk pacienta, tzv. patientské tumoroidy (PDOs) nebo PDTOs. Tyto kultury z nádorového materiálu zachovávají histologické i genetické charakteristiky původních nádorů (Boj et al., 2015; Dijkstra et al., 2018). Vlachogiannis et al. (2018) testovali léčiva s 88% úspěšností určení citlivosti na léčbu, pro případy PDO z kolorektálních a gastroesofagiálních karcinomů, které vykazovaly shodný mutační profil jako původní tumory (Vlachogiannis et al., 2018). Organoidy navíc přirozeně uchovávají heterogenitu nádoru, takže jejich dlouhodobá kultivace podporuje sledování klonálních evolučních změn a rezistence (Bose et al., 2021; Li et al., 2023; Rossi et al., 2018).

Pacientské nádorové organoidy se tak stávají ideální platformou pro vyhledávání účinných protinádorových léčiv, tvorbu „živých biobank“ různých typů nádorů

a systematické testování individuálních terapií (Perrone et al., 2021). Díky možnosti rozmanitých manipulací, jako je například ko-kultivace s imunitními buňkami, je lze využít i ve výzkumu imunoonkologie či identifikaci kmenových (driver) mutací (Dijkstra et al., 2018). Také studie provedené na organoidových modelech prsou ukazují, že struktury složené výlučně z nádorových buněk umožňují predikovat klinickou účinnost léčby pacienta s vysokou spolehlivostí (Soto-Gamez et al., 2024). Všechny aplikace organoidů odvozených od nádorových buněk jsou vyobrazeny na obrázku 13.



Obrázek 13: Aplikace organoidů odvozených z nádorových buněk, převzato z (Frandsen, 2022; Schutgens et al., 2020)

Kromě metastatických nádorů vznikají spousty nových organoidů z běžných nádorů tlustého střeva, plic, pankreatu, prsu aj., díky kterým se budují rozsáhlé biobanky pro výzkum molekulárních podtypů nádorů (Bose et al., 2021; Broutier et al., 2017; Dijkstra et al., 2018; Soto-Gamez et al., 2024). Významnou výhodou modelů PDO je, že je lze dlouhodobě kultivovat a pasážovat a díky tomu použít pro HTS (Durens et al., 2020; Lampart et al., 2023). To by umožnilo rozšířit cytodiagnostiku i na personalizované lékové testy *in vitro*, které doplní informace z klasických patologických vyšetření.

3.2.6 Organoidy v buněčné a molekulární diagnostice

Organoidy se stávají užitečným nástrojem i v laboratorní diagnostice. V cytopatologii a histopatologii slouží jako modely pro hodnocení buněčné morfologie a imunofenotypu nádorových buněk. Studie potvrzují, že PDOs zachovávají buněčné uspořádání

a histologické vzory původních nádorů. Barvení hematoxylinem-eosinem vykazuje shodné architektonické rysy a imunohistochemické markery, například cytokeratiny, mají v organoidech stejný distribuční profil jako v primárních nádorech (Perrone et al., 2021; Vlachogiannis et al., 2018; Zhao et al., 2022). Na orgánových modelech lze proto validovat nové diagnostické protilátky a posuzovat lokalizaci nádorových antigenů či specifických kináz v kontextu 3D tkáně (Barkauskas et al., 2017; Li et al., 2023).

Další využití naleznou organoidy v molekulové diagnostice. Jsou zdrojem buněčné hmoty, z níž lze izolovat DNA/RNA a analyzovat genetické biomarkery (mutace, amplifikace, fúze genů) s větší autentičností než u 2D kultur (Rossi et al., 2018; Vlachogiannis et al., 2018; Zhou et al., 2021). Organoidové biobanky nádorů usnadňují identifikaci vzácných mutačních profilů a testování genové exprese v reálném mikroprostředí tkáně (Calà et al., 2023; Perrone et al., 2021; Wang et al., 2022). Díky schopnosti dlouhodobého růstu v laboratorních podmínkách poskytují tyto modely dostatečné množství buněk pro molekulární testy, které by jinak na vzorku z biopsie nebylo možné provést (Boj et al., 2015; Liu et al., 2021).

V toxikologické patologii již byly dokonce organoidy využity ke sledování raných stádií karcinogeneze. Po vystavení organoidů karcinogenům se objevují prekancerózní změny cytomorfolgie a *in situ* hybridizační či imunohistochemické markery pomáhají přesně detekovat transformaci buněk (Dijkstra et al., 2018; Zhao et al., 2022). Tento přístup rozšiřuje možnosti cytopatologických hodnocení o testování látkové karcinogenity v modelu blízkém lidskému (Bosáková et al., 2022).

V diagnostice mohou organoidy modelovat patologické procesy a tím doplňovat konvenční diagnostické metody. Umožňují například ověřit účinnost nových diagnostických souprav nebo látkových markerů přímo na lidské tkáni (Li et al., 2023; Zhou et al., 2021).

Celkově organoidové technologie posouvají diagnostiku směrem k buněčným a molekulárním metodám, protože kombinují autentičnost lidské tkáně s rozšiřitelností laboratorního modelu (Barkauskas et al., 2017; Perrone et al., 2021; Zhao et al., 2022). V budoucnu se očekává, že spolu s pokroky v obrazové cytometrii a genomice umožní přesnější personalizované diagnózy a léčebné strategie založené na 3D modelu konkrétního pacienta (Calà et al., 2023; Papamichail et al., 2025).

4 Porovnání organoidů a sféroidů

Organoidy a sféroidy představují podobné, ale v mnoha směrech rozdílné 3D modely. Tabulka níže shrnuje klíčové vlastnosti 3D buněčných modelů z hlediska jejich původu, struktury, náročnosti kultivace a praktického využití. Informace shrnuté v tabulce 2 poukazují na hlavní rozdíly mezi těmito systémy, zejména co se týká reprodukovatelnosti, translační hodnoty pro aplikace v biomedicině a nákladů na jejich přípravu. Toto porovnání může výrazně usnadnit výběr vhodného modelu podle konkrétního klinického nebo experimentálního záměru, ke kterému chceme tyto 3D struktury využít.

Tabulka 2: Porovnání sféroidů a organoidů, převzato z (Živković et al., 2025).

Kategorie	Sféroidy	Organoidy
Buněčný původ	Buněčné linie, primární buněčné linie, jednotlivé nádorové buňky, směsi buněk, tkáň	Buněčné linie, primární buněčné linie, jednotlivé nádorové buňky, směsi buněk, tkáň
Struktura	Vícevrstevná struktura	Odráží specifické charakteristiky tkáně
Tvorba	Snadná, agregační metody	Obtížná, vyžaduje specifické kultivační podmínky a signální molekuly
Kultivace	Obtížné dlouhodobě udržet	Dlouhodobá kultivace a kryokonzervace
Vaskularizace	Žádná nebo omezená	Lze indukovat, ale často nedostatečná
Reprodukovatelnost	Vysoká	Střední
Translační hodnota	Omezená	Vysoká
Cena	Relativně nízká	Vysoká
Aplikace	Testování léčiv, toxikologie, modelování nádorů	Modelování chorob, regenerativní medicína, personalizovaná medicína

4.1 Úskalí aplikací sféroidů a organoidů

Použití trojrozměrných buněčných struktur v praxi s sebou nese řadu výzev, především z důvodu jejich složité struktury.

4.1.1 Variabilita

Formování 3D modelů je velmi citlivé na podmínky. Jedná se například o druh buněk, hustotu nasazené buněčné kultury, typ kultivační metody či složení živného média. Všechny tyto faktory výrazně ovlivňují výslednou morfologii a znesnadňuje reprodukovatelnost experimentů. Dosažení konzistentní velikosti a homogenity u trojrozměrných struktur při opakovaných experimentech bývá velmi obtížné a je nutné s tím ve výsledcích počítat (Han et al., 2021). Bez jednotné velikosti pak nelze snadno porovnávat míru proliferace nebo viability mezi vzorky, což omezuje standardizaci testů na 3D modelech.

4.1.2 Difúzní limity

Jak už bylo zmíněno, větší trojrozměrné modely, o velikostech nad 200 μm , spontánně vytváří strukturu se třemi vrstvami buněk. Vnější vrstva je proliferující, vnitřní vrstvu tvoří naopak buňky zklidněné a střed se stává hypoxickým až nekrotickým (Gunti et al., 2021). Tento jev je důsledkem omezeného přístupu kyslíku a živin do vnitřních vrstev 3D struktur (Han et al., 2021). Důsledkem je, že hlubší vrstvy mohou po čase začít nekrotizovat a výrazně měnit metabolismus celé struktury (Soroka et al., 2019). To komplikuje interpretaci výsledků testů, kdy se léčivo nebo toxiny k vnitřní vrstvě buněk dostávají s prodlevou nebo vůbec, což zapříčiňuje, že odezvy ve 3D nejsou homogenní. Navíc absence cévního zásobení omezuje maximální velikost a tím nám znemožňuje pozorování a testy na strukturách podobných tumorům v pozdním stádiu (Białkowska et al., 2020). V praxi tedy sféroidy odpovídají hlavně avaskulárnímu nádoru a nelze jimi věrně modelovat plně vyvinutou vaskularizovanou tkáň. U organoidů velmi záleží na buněčné linii, ze které jsou tvořeny, ale obecný princip je stejný (Zagare et al., 2021). Pro zlepšení se testují mikrofluidické systémy s perfuzí média, bioreaktory se stálým mícháním nebo směsí s kyslíkem a živinami (Papamichail et al., 2025). Nicméně tyto technologie ale znamenají vyšší náklady, náročnější obsluhu a riziko poškození.

4.1.3 Heterogenita buněčných zdrojů a diferenciaci

Příkladem mohou být organoidy, které jsou odvozené od sekundárních tkání nebo iPSC vykazují variabilní schopnost diferenciaci a tendenci k metabolickému stresu v jádře (Kelava et al., 2016). Navíc u různých dárců nebo izolací může docházet ke genetické diverzitě a klonálním odlišnostem (Meran et al., 2020). Oba tyto děje komplikují vývoj klinických biobank a personalizovaných terapií, kde je nutné minimalizovat proměnné jak u dárce, tak u protokolu kultivace.

4.1.4 Technické a analytické limity

Obtíže s technikou pro sledování a měření jsou dalším problémem, se kterým se při kultivaci 3D modelů setkáváme. Limity a nevýhody jednotlivých kultivačních postupů jsou již popsány v předchozích kapitolách pro každou metodu zvlášť.

4.1.5 Extracelulární matrix a materiálová variabilita

Běžně se pro kultivaci 3D buněčných struktur používá matrigel, což je laminin-bohatý gel odvozený od Engelbreth-Holm-Swarm sarkomu. Jeho hlavními nevýhodami jsou *batch-to-batch* variabilita, tedy rozdíl ve složení mezi jednotlivými šaržemi, což omezuje reprodukovatelnost experimentů (Vives et al., 2020). Nadějnou alternativou se staly syntetické hydrogely, například peptidové nebo *PEG-based* matrice, které lze chemicky definovat a modulovat mechanické vlastnosti, avšak ty často postrádají podporu pro buněčnou adhezi a diferenciaci stejně jako přírodní gely (Meran et al., 2020). Nově se do kurzu dostávají hydrogely z dECM připravené z cílové tkáně, které si zachovávají index mastných kyselin, glykoproteinů a růstových faktorů. Jejich příprava je ale složitá a může vykazovat zbytky imunogenních složek (Bhattacharya et al., 2023; Li et al., 2024).

4.1.6 Složení a fyziologická relevance kultivačních médií

Klasická kultivační média (např. DMEM/F12) často obsahují nefyziologicky vysoké koncentrace glukózy a aminokyselin, což může zkreslovat metabolické profily u 3D modelů odvozených ze zdravých buněčných linií (Kelava et al., 2016; Lagziel et al., 2020). Také byla vyvinuta *human plasma-like* média (HPLM) nebo Plasmax, která nabízejí nutriční složení odpovídající lidské plazmě a prokázaly lepší udržení *in vivo* fenotypu a snížení metabolického stresu (Kelava et al., 2016; Lagziel et al., 2020; Leney-

Greene et al., 2020). Navíc je nutné optimalizovat pH, osmolaritu a skladbu iontů pro různé typy trojrozměrných struktur, což zvyšuje nároky a komplikuje standardizaci protokolů.

4.1.7 Reprodukovatelnost, rozlišitelnost a náklady

Nízká standardizace ECM, nutričních protokolů a použití různých buněčných linií vede k omezené reprodukovatelnosti mezi laboratořemi (Vives et al., 2020). Masová produkce vyžaduje automatizaci, která přináší vysoké investiční i provozní náklady. Rovněž je třeba brát v úvahu problém dlouhodobého pasážování, kdy dochází ke ztrátě růstových struktur a fenotypovým změnám (Sugimoto et al., 2021).

ZÁVĚR

Buněčné sféroidy představují moderní, dynamicky se rozvíjející platformu pro 3D kultivaci buněk, která nachází široké uplatnění v základním i aplikovaném výzkumu. Jejich hlavní výhodou je schopnost lépe imitovat fyziologické podmínky organismu ve srovnání s klasickými 2D kulturami, a to především díky prostorové organizaci, heterogenitě, přítomnosti difúzních gradientů a realistickým buněčným interakcím. Výsledkem je větší věrohodnost výsledků získaných při testování účinků léčiv, studiu genové exprese, apoptózy, diferenciaci či interakce s imunitním systémem.

V této práci jsou popsány různé metody přípravy sféroidů, od jednodušších *scaffold-free* přístupů, až po pokročilé *scaffold-based* a mikrofluidní systémy. Každá metoda má své specifické výhody a omezení, které se snaží laboratoře kompenzovat, a je třeba je zohlednit při výběru vhodného modelu. Důležitou součástí je rovněž hodnocení viability a metabolické aktivity, kde byly popsány výhody ATP testů či měření aktivity LDH oproti méně vhodným barvicím metodám v 3D prostředí.

Sféroidy mají zásadní význam nejen v oblasti vývoje a testování léčiv, ale i pro personalizovanou medicínu, kde umožňují predikci odpovědi konkrétního pacienta na léčbu. Stávají se rovněž klíčovým nástrojem pro nahrazení testů na zvířatech, čímž přispívají k etičtějšímu a efektivnějšímu biomedicínskému výzkumu. I přes řadu technických a metodických výzev je zřejmé, že význam sféroidních modelů v blízké budoucnosti poroste, a s ním i potřeba jejich standardizace, validace a širší implementace v laboratořích.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Abuwatfa, W. H., Pitt, W. G., et al. (2024). Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *Journal of Biomedical Science*, 31(1), s. 39, Article 7. doi: 10.1186/s12929-024-00994-y
2. Antoni, D., Burckel, H., et al. (2015). Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), s. 5517-5527. doi: 10.3390/ijms16035517
3. Bai, L., Wu, Y., et al. (2024). AI-enabled organoids: Construction, analysis, and application. *Bioactive Materials*, 31, s. 525-548. doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.09.005
4. Baldassari, S., Musante, I., et al. (2020). Brain Organoids as Model Systems for Genetic Neurodevelopmental Disorders. *FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 8, s. 9, Article 590119. doi: 10.3389/fcell.2020.590119
5. Barkauskas, C. E., Chung, M.-I., et al. (2017). Lung organoids: current uses and future promise. *Development*, 144(6), s. 986-997. doi: 10.1242/dev.140103
6. Basu, S., Aich, J., et al. (2021). Two-Dimensional and Three-Dimensional Cell Culture and Their Applications. In X. Zhan (Ed.), *Cell Culture - Advanced Technology and Applications in Medical and Life Sciences* (s. 26). IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.100382
7. Bhattacharya, A., Alam, K., et al. (2023). Exploring the interaction between extracellular matrix components in a 3D organoid disease model to replicate the pathophysiology of breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 42(1), s. 29, Article 343. doi: 10.1186/s13046-023-02926-4
8. Białkowska, K., Komorowski, P., et al. (2020). Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int J Mol Sci*, 21(17), s. 17, Article 6225. doi: 10.3390/ijms21176225
9. Boj, Sylvia F., Hwang, C.-I., et al. (2015). Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell*, 160(1), s. 324-338. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.021
10. Boj, S. F., Vonk, A. M., et al. (2017). Forskolin-induced Swelling in Intestinal Organoids: An In Vitro Assay for Assessing Drug Response in Cystic Fibrosis Patients. *JOVE-JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS*(120), s. 12, Article e55159. doi: 10.3791/55159
11. Bosáková, V., De Zuani, M., et al. (2022). Lung Organoids-The Ultimate Tool to Dissect Pulmonary Diseases? *FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 10, s. 19, Article 899368. doi: 10.3389/fcell.2022.899368
12. Bose, S., Clevers, H., et al. (2021). Promises and challenges of organoid-guided precision medicine. *Med*, 2(9), s. 1011-1026. doi: 10.1016/j.medj.2021.08.005
13. Broutier, L., Mastrogiovanni, G., et al. (2017). Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nature Medicine*, 23(12), s. 1424-1435. doi: 10.1038/nm.4438

14. Calà, G., Sina, B., et al. (2023). Primary human organoids models: Current progress and key milestones. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, *11*, s. 17, Article 1058970. doi: 10.3389/fbioe.2023.1058970
15. Clarke, G. A., Hartse, B. X., et al. (2021). Advancement of Sensor Integrated Organ-on-Chip Devices. *SENSORS*, *21*(4), s. 43, Article 1367. doi: 10.3390/s21041367
16. Costa, E. C., Moreira, A. F., et al. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *BIOTECHNOLOGY ADVANCES*, *34*(8), s. 1427-1441. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002
17. Cox, M. C., Mendes, R., et al. (2021). Application of LDH assay for therapeutic efficacy evaluation of ex vivo tumor models. *SCIENTIFIC REPORTS*, *11*(1), s. 14, Article 18571. doi: 10.1038/s41598-021-97894-0
18. Crnogorac, M. D., Matic, I. Z., et al. (2021). 3D HeLa spheroids as a model for investigating the anticancer activity of Biginelli-hybrids. *CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS*, *345*, s. 11, Article 109565. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109565
19. Däster, S., Amatruda, N., et al. (2017). Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment. *ONCOTARGET*, *8*(1), s. 1725-1736. doi: 10.18632/oncotarget.13857
20. Diez-Pascual, A. M. (2017). Tissue Engineering Bionanocomposites Based on Poly(propylene fumarate). *POLYMERS*, *9*(7), s. 19, Article 260. doi: 10.3390/polym9070260
21. Dijkstra, K. K., Cattaneo, C. M., et al. (2018). Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell*, *174*(6), s. 1586-1598.e1512. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.009
22. Din, S. U., Ounjai, P., et al. (2024). CO₂-Free On-Stage Incubator for Live Cell Imaging of Cholangiocarcinoma Cell Migration on Microfluidic Device. *Methods and Protocols*, *7*(5), s. 14, Article 69. doi: 10.3390/mps7050069
23. Durens, M., Nestor, J., et al. (2020). High-throughput screening of human induced pluripotent stem cell-derived brain organoids. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS*, *335*, s. 8, Article 108627. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108627
24. Duval, K., Grover, H., et al. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*, *32*(4), s. 266-277. doi: 10.1152/physiol.00036.2016
25. Fatehullah, A., Tan, S. H., et al. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature Cell Biology*, *18*(3), s. 246-254. doi: 10.1038/ncb3312
26. Ferreira, L. P., Gaspar, V. M., et al. (2021). Organotypic 3D decellularized matrix tumor spheroids for high-throughput drug screening. *BIOMATERIALS*, *275*, s. 18, Article 120983. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.120983
27. Fontoura, J. C., Viezzer, C., et al. (2020). Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, *107*, s. 10, Article 110264. doi: 10.1016/j.msec.2019.110264

28. Foty, R. (2011). A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *JOVE-JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS*(51), s. 4, Article e2720. doi: 10.3791/2720
29. Frandsen, H. S. (2022, June 26). 3D cell culture strategies: Their advantages and limitations. <https://lifescience invitro.co.nz/resources/our-blog/3d-cell-culture-strategies-their-advantages-and-limitations/>
30. Górska, A., Trubalski, M., et al. (2024). Navigating stem cell culture: insights, techniques, challenges, and prospects. *FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 12, s. 12, Article 1435461. doi: 10.3389/fcell.2024.1435461
31. Guarnizo-Mendez, H. F., Benítez, A. V. F., et al. (2021). *SSCF-Hyperthermia Study in MCF-7 Spheroids - In Silicio* APPLIED COMPUTER SCIENCES IN ENGINEERING, WEA 2021, s. 225-236. doi: 10.1007/978-3-030-86702-7_20
32. Guimaraes, A. P. P., Calori, I. R., et al. (2024). SpheroMold: modernizing the hanging drop method for spheroid culture [Original Research]. *Frontiers in Drug Delivery, Volume 4 - 2024*, s. 6, Article 1397153. doi: 10.3389/fddev.2024.1397153
33. Gunti, S., Hoke, A. T. K., et al. (2021). Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications [Review]. *Cancers*, 13(4), s. 17, Article 874. doi: 10.3390/cancers13040874
34. Gupta, P., Ismadi, M. Z., et al. (2016). Optimization of agitation speed in spinner flask for microcarrier structural integrity and expansion of induced pluripotent stem cells. *CYTOTECHNOLOGY*, 68(1), s. 45-59. doi: 10.1007/s10616-014-9750-z
35. Han, S. J., Kwon, S., et al. (2021). Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *CANCER CELL INTERNATIONAL*, 21(1), s. 19, Article 152. doi: 10.1186/s12935-021-01853-8
36. Hirschhaeuser, F., Menne, H., et al. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 148(1), s. 3-15. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012
37. Hofmann, S., Cohen-Harazi, R., et al. (2022). Patient-derived tumor spheroid cultures as a promising tool to assist personalized therapeutic decisions in breast cancer. *TRANSLATIONAL CANCER RESEARCH*, 11(1), s. 134-147. doi: 10.21037/tcr-21-1577
38. Huch, M., Dorrell, C., et al. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, 494(7436), s. 247-250. doi: 10.1038/nature11826
39. Hurrell, T., Ellero, A. A., et al. (2018). Characterization and reproducibility of HepG2 hanging drop spheroids toxicology in vitro. *TOXICOLOGY IN VITRO*, 50, s. 86-94. doi: 10.1016/j.tiv.2018.02.013
40. Chauhdari, T., Zaidi, S. A., et al. (2025). Organoids meet microfluidics: recent advancements, challenges, and future of organoids-on-chip. *In vitro models*, 4(1), s. 71-88. doi: 10.1007/s44164-025-00086-7
41. Chen, G., Liu, W., et al. (2022). Breast Cancer MCF-7 Cell Spheroid Culture for Drug Discovery and Development. *J Cancer Ther*, 13(3), s. 117-130. doi: 10.4236/jct.2022.133009

42. Choi, H., Choi, W. S., et al. (2024). A Review of Advanced Hydrogel Applications for Tissue Engineering and Drug Delivery Systems as Biomaterials. *Gels*, 10(11), s. 23, Article 693. doi: 10.3390/gels10110693
43. Choi, K. Y. G., Wu, B. C., et al. (2020). Utilizing Organoid and Air-Liquid Interface Models as a Screening Method in the Development of New Host Defense Peptides. *FRONTIERS IN CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY*, 10, s. 24, Article 228. doi: 10.3389/fcimb.2020.00228
44. Jubelin, C., Muñoz-Garcia, J., et al. (2023). Technical report: liquid overlay technique allows the generation of homogeneous osteosarcoma, glioblastoma, lung and prostate adenocarcinoma spheroids that can be used for drug cytotoxicity measurements [Original Research]. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, Volume 11 - 2023*, s. 9, Article 1260049. doi: 10.3389/fbioe.2023.1260049
45. Jung, G. S., Lee, K. M., et al. (2013). Morphogenetic and neuronal characterization of human neuroblastoma multicellular spheroids cultured under undifferentiated and all-trans-retinoic acid-differentiated conditions. *BMB REPORTS*, 46(5), s. 276-281. doi: 10.5483/BMBRep.2013.46.5.196
46. Kaliaraj, G. S., Shanmugam, D. K., et al. (2023). Hydrogels-A Promising Materials for 3D Printing Technology. *Gels*, 9(3), s. 28, Article 260. doi: 10.3390/gels9030260
47. Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016). Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Developmental Biology*, 420(2), s. 199-209. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.06.037
48. Kijanska, M., & Kelm, J. (2016). In vitro 3D Spheroids and Microtissues: ATP-based Cell Viability and Toxicity Assays. In S. Markossian, A. Grossman, et al. (Eds.), *Assay Guidance Manual* (s. 13). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
49. Kim, J. I., Imaizumi, K., et al. (2025). Human assembloid model of the ascending neural sensory pathway. *Nature*, 642(8066), s. 143-153. doi: 10.1038/s41586-025-08808-3
50. Kim, M. H., Singh, Y. P., et al. (2024). High-throughput bioprinting of spheroids for scalable tissue fabrication. *NATURE COMMUNICATIONS*, 15(1), s. 21, Article 10083. doi: 10.1038/s41467-024-54504-7
51. Kim, W., Gwon, Y., et al. (2023). Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration [Review]. *Bioactive Materials*, 19, s. 50-74. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.03.039
52. Krenn, V., Bosone, C., et al. (2021). Organoid modeling of Zika and herpes simplex virus 1 infections reveals virus-specific responses leading to microcephaly. *Cell Stem Cell*, 28(8), s. 1362-1379.e1367. doi: 10.1016/j.stem.2021.03.004
53. Kundu, B., Bastos, A. R. F., et al. (2019). Mechanical Property of Hydrogels and the Presence of Adipose Stem Cells in Tumor Stroma Affect Spheroid Formation in the 3D Osteosarcoma Model. *ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES*, 11(16), s. 14548-14559. doi: 10.1021/acsami.8b22724

54. Lagziel, S., Gottlieb, E., et al. (2020). Mind your media. *Nature Metabolism*, 2(12), s. 1369-1372. doi: 10.1038/s42255-020-00299-y
55. Lampart, F. L., Iber, D., et al. (2023). Organoids in high-throughput and high-content screenings. *FRONTIERS IN CHEMICAL ENGINEERING*, 5, s. 12, Article 1120348. doi: 10.3389/fceng.2023.1120348
56. Lancaster, M. A., Renner, M., et al. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), s. 373-379. doi: 10.1038/nature12517
57. Lee, S. Y., Koo, I. S., et al. (2023). In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discov*, 28(4), s. 119-137. doi: 10.1016/j.slasd.2023.03.006
58. Leney-Greene, M. A., Boddapati, A. K., et al. (2020). Human Plasma-like Medium Improves T Lymphocyte Activation. *iScience*, 23(1), s. 21, Article 100759. doi: 10.1016/j.isci.2019.100759
59. Li, C., An, N., et al. (2024). Enhancing organoid culture: harnessing the potential of decellularized extracellular matrix hydrogels for mimicking microenvironments. *Journal of Biomedical Science*, 31(1), s. 25, Article 96. doi: 10.1186/s12929-024-01086-7
60. Li, Y., Gao, X. Y., et al. (2023). The application of patient-derived organoid in the research of lung cancer. *CELLULAR ONCOLOGY*, 46(3), s. 503-519. doi: 10.1007/s13402-023-00771-3
61. Li, Y., Wang, J., et al. (2021). Electrospun fibrous sponge via short fiber for mimicking 3D ECM. *JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY*, 19(1), s. 15, Article 131. doi: 10.1186/s12951-021-00878-5
62. Liu, L., Yu, L., et al. (2021). Patient-derived organoid (PDO) platforms to facilitate clinical decision making. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), s. 9, Article 40. doi: 10.1186/s12967-020-02677-2
63. Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *TISSUE ENGINEERING PART B-REVIEWS*, 19(6), s. 485-502. doi: 10.1089/ten.teb.2012.0437
64. Ma, Y., Wang, X., et al. (2022). Recent Advances in Macroporous Hydrogels for Cell Behavior and Tissue Engineering. *Gels*, 8(10), s. 32, Article 606. doi: 10.3390/gels8100606
65. Meran, L., Massie, I., et al. (2020). Engineering transplantable jejunal mucosal grafts using patient-derived organoids from children with intestinal failure. *Nature Medicine*, 26(10), s. 1593-1601. doi: 10.1038/s41591-020-1024-z
66. Mirsky, N. A., Ehlen, Q. T., et al. (2024). Three-Dimensional Bioprinting: A Comprehensive Review for Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *BIOENGINEERING-BASEL*, 11(8), s. 41, Article 777. doi: 10.3390/bioengineering11080777

67. Mitrakas, A. G., Tsolou, A., et al. (2023). Applications and Advances of Multicellular Tumor Spheroids: Challenges in Their Development and Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), s. 21, Article 6949. doi: 10.3390/ijms24086949
68. Mohan, T. S., Datta, P., et al. (2022). 3D coaxial bioprinting: process mechanisms, bioinks and applications. *PROGRESS IN BIOMEDICAL ENGINEERING*, 4(2), s. 26, Article 022003. doi: 10.1088/2516-1091/ac631c
69. Mosaad, E. O., Chambers, K. F., et al. (2018). The Microwell-mesh: A high-throughput 3D prostate cancer spheroid and drug-testing platform. *SCIENTIFIC REPORTS*, 8(1), s. 12, Article 253. doi: 10.1038/s41598-017-18050-1
70. Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*, 163, s. 94-108. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013
71. Nunes, A. S., Barros, A. S., et al. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 116(1), s. 206-226. doi: 10.1002/bit.26845
72. Panuska, P., Smejkal, J., et al. (2024). Advanced Microfluidic Platform for Tumor Spheroid Formation and Cultivation Fabricated from OSTE plus Polymer. *BIOCHIP JOURNAL*, 18(3), s. 393-409. doi: 10.1007/s13206-024-00167-x
73. Papamichail, L., Koch, L. S., et al. (2025). Organoids-on-a-chip: microfluidic technology enables culture of organoids with enhanced tissue function and potential for disease modeling. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, 13, s. 23, Article 1515340. doi: 10.3389/fbioe.2025.1515340
74. Papapostolou, I., Bochen, F., et al. (2023). A Simple and Fast Method for the Formation and Downstream Processing of Cancer-Cell-Derived 3D Spheroids: An Example Using Nicotine-Treated A549 Lung Cancer 3D Spheres. *Methods and Protocols*, 6(5), s. 10, Article 94. doi: 10.3390/mps6050094
75. Perrone, F., & Zilbauer, M. (2021). Biobanking of human gut organoids for translational research. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(10), s. 1451-1458. doi: 10.1038/s12276-021-00606-x
76. Piccinini, F. (2015). AnaSP: A software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. *COMPUTER METHODS AND PROGRAMS IN BIOMEDICINE*, 119(1), s. 43-52. doi: 10.1016/j.cmpb.2015.02.006
77. Pinto, B., Henriques, A. C., et al. (2020). Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *PHARMACEUTICS*, 12(12), s. 38, Article 1186. doi: 10.3390/pharmaceutics12121186
78. Pipiya, V. V., Gilazieva, Z. E., et al. (2024). Comparison of primary and passaged tumor cell cultures and their application in personalized medicine. *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*, 5(3), s. 19, Article 581. doi: 10.37349/etat.2024.00237

79. Quadrato, G., Nguyen, T., et al. (2017). Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*, 545(7652), s. 48-53. doi: 10.1038/nature22047
80. Rabiet, L., Arakelian, L., et al. (2024). Acoustic levitation as a tool for cell-driven self-organization of human cell spheroids during long-term 3D culture. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 121(4), s. 1422-1434. doi: 10.1002/bit.28651
81. Raza, H., Raja, M., et al. (2025). Supervised autoregressive eXogenous Networks with Fractional Grünwald-Letnikov finite differences: Tumor Evolution and Immune Responses under Therapeutic Influence fractals model. *BIOMEDICAL SIGNAL PROCESSING AND CONTROL*, 107, s. 12, Article 107871. doi: 10.1016/j.bspc.2025.107871
82. Ricci, M., Dimitri, M., et al. (2025). Morphological Analysis of US Treated PANC-1 Spheroids. *APPLIED SCIENCES-BASEL*, 15(4), s. 13, Article 1707. doi: 10.3390/app15041707
83. Riss, T. L., Moravec, R. A., et al. (2016). Cell Viability Assays. In S. Markossian, A. Grossman, et al. (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
84. Rodrigues, D. B., Reis, R. L., et al. (2024). Modelling the complex nature of the tumor microenvironment: 3D tumor spheroids as an evolving tool. *Journal of Biomedical Science*, 31(1), s. 22, Article 13. doi: 10.1186/s12929-024-00997-9
85. Rossi, G., Manfrin, A., et al. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*, 19(11), s. 671-687. doi: 10.1038/s41576-018-0051-9
86. Ryu, N. E., Lee, S. H., et al. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *CELLS*, 8(12), s. 13, Article 1620. doi: 10.3390/cells8121620
87. Sachs, N., Papaspyropoulos, A., et al. (2019). Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *The EMBO Journal*, 38(4), s. 20, Article e100300. doi: 10.15252/embj.2018100300
88. Sailer, V., Pauli, C., et al. (2017). On-site Cytology for Development of Patient-Derived Three-dimensional Organoid Cultures - A Pilot Study. *Anticancer Res*, 37(4), s. 1569-1573. doi: 10.21873/anticancer.11486
89. Sampaziotis, F., Muraro, D., et al. (2021). Cholangiocyte organoids can repair bile ducts after transplantation in the human liver. *Science*, 371(6531), s. 839-846. doi: 10.1126/science.aaz6964
90. Sato, T., van Es, J. H., et al. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), s. 415-418. doi: 10.1038/nature09637
91. Sato, T., Vries, R. G., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), s. 262-265. doi: 10.1038/nature07935
92. Servier. (2021, 2021). *Servier Medical Art*. Servier. Retrieved June 25 from <https://smart.servier.com>

93. Schutgens, F., & Clevers, H. (2020). Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. In A. K. Abbas, J. C. Aster, et al. (Eds.), *ANNUAL REVIEW OF PATHOLOGY: MECHANISMS OF DISEASE, VOL 15, 2020* (Vol. 15, s. 211-234). doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611
94. Schwank, G., Koo, B.-K., et al. (2013). Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell*, 13(6), s. 653-658. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.002
95. Simao, V. A., Brand, H., et al. (2023). Adipose-derived stem cells (ASCs) culture in spinner flask: improving the parameters of culture in a microcarrier-based system. *BIOTECHNOLOGY LETTERS*, 45(7), s. 823-846. doi: 10.1007/s10529-023-03367-x
96. Soroka, C. J., Assis, D. N., et al. (2019). Bile-Derived Organoids From Patients With Primary Sclerosing Cholangitis Recapitulate Their Inflammatory Immune Profile. *Hepatology*, 70(3), s. 871-882. doi: 10.1002/hep.30470
97. Soto-Gamez, A., Gunawan, J. P., et al. (2024). Organoid-based personalized medicine: from tumor outcome prediction to autologous transplantation. *Stem Cells*, 42(6), s. 499-508. doi: 10.1093/stmcls/sxae023
98. Souza, G. R., Molina, J. R., et al. (2010). Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *NATURE NANOTECHNOLOGY*, 5(4), s. 291-296. doi: 10.1038/nnano.2010.23
99. Steinwerth, P., Bertrand, J., et al. (2024). Structural and Molecular Changes of Human Chondrocytes Exposed to the Rotating Wall Vessel Bioreactor. *BIOMOLECULES*, 14(1), s. 24, Article 25. doi: 10.3390/biom14010025
100. Sugimoto, S., Kobayashi, E., et al. (2021). An organoid-based organ-repurposing approach to treat short bowel syndrome. *Nature*, 592(7852), s. 99-104. doi: 10.1038/s41586-021-03247-2
101. Takahashi, Y., Hori, Y., et al. (2015). 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *BIOSCIENCE REPORTS*, 35(3), s. 7, Article e00208. doi: 10.1042/BSR20150034
102. Tepe, U., Guler, B. A., et al. (2023). Applications and sensory utilizations of magnetic levitation in 3D cell culture for tissue Engineering. *MOLECULAR BIOLOGY REPORTS*, 50(8), s. 7017-7025. doi: 10.1007/s11033-023-08585-0
103. Tchoryk, A., Taresco, V., et al. (2019). Penetration and Uptake of Nanoparticles in 3D Tumor Spheroids. *BIOCONJUGATE CHEMISTRY*, 30(5), s. 1371-1384. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00136
104. Tian, C.-m., Yang, M.-f., et al. (2023). Stem cell-derived intestinal organoids: a novel modality for IBD. *Cell Death Discovery*, 9(1), s. 16, Article 255. doi: 10.1038/s41420-023-01556-1
105. Urbanczyk, M., Zbinden, A., et al. (2020). Controlled Heterotypic Pseudo-Islet Assembly of Human β -Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells Using Magnetic Levitation. *TISSUE ENGINEERING PART A*, 26(7-8), s. 387-399. doi: 10.1089/ten.tea.2019.0158

106. Velasco, V., Shariati, S. A., et al. (2020). Microtechnology-based methods for organoid models. *MICROSYSTEMS & NANOENGINEERING*, 6(1), s. 13, Article 76. doi: 10.1038/s41378-020-00185-3
107. Venkataraman, L., Fair, S., et al. (2020). Modeling neurodegenerative diseases with cerebral organoids and other three-dimensional culture systems: focus on Alzheimer's disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18, s. 696-717. doi: 10.1007/s12015-020-10068-9
108. Vitacolonna, M., Bruch, R., et al. (2024). A multiparametric analysis including single-cell and subcellular feature assessment reveals differential behavior of spheroid cultures on distinct ultra-low attachment plate types. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, 12, s. 19, Article 1422235. doi: 10.3389/fbioe.2024.1422235
109. Vives, J., & Battle-Morera, L. (2020). The challenge of developing human 3D organoids into medicines. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), s. 4, Article 72. doi: 10.1186/s13287-020-1586-1
110. Vlachogiannis, G., Hedayat, S., et al. (2018). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 359(6378), s. 920-926. doi: 10.1126/science.aao2774
111. Wang, Q., Guo, F., et al. (2022). Applications of human organoids in the personalized treatment for digestive diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), s. 30, Article 336. doi: 10.1038/s41392-022-01194-6
112. Weiskirchen, S., Schröder, S. K., et al. (2023). A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *CELLS*, 12(5), s. 23, Article 682. doi: 10.3390/cells12050682
113. Wensink, G. E., Elias, S. G., et al. (2021). Patient-derived organoids as a predictive biomarker for treatment response in cancer patients. *npj Precision Oncology*, 5(1), s. 13, Article 30. doi: 10.1038/s41698-021-00168-1
114. Wissing, T. B., Bonito, V., et al. (2019). Macrophage-Driven Biomaterial Degradation Depends on Scaffold Microarchitecture. *FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, 7, s. 20, Article 87. doi: 10.3389/fbioe.2019.00087
115. Wu, T. S., Zhan, Q. L., et al. (2017). The protective effects of resveratrol, H₂S and thermotherapy on the cell apoptosis induced by CdTe quantum dots. *TOXICOLOGY IN VITRO*, 41, s. 106-113. doi: 10.1016/j.tiv.2017.02.013
116. Yoo, S., & Lee, H. J. (2025). Spheroid-Hydrogel-Integrated Biomimetic System: A New Frontier in Advanced Three-Dimensional Cell Culture Technology. *CELLS TISSUES ORGANS*, 214(2), s. 128-147. doi: 10.1159/000541416
117. Zagare, A., Gobin, M., et al. (2021). A robust protocol for the generation of human midbrain organoids. *STAR PROTOCOLS*, 2(2), s. 14, Article 100524. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100524
118. Zanoni, M., Piccinini, F., et al. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *SCIENTIFIC REPORTS*, 6, s. 11, Article 19103. doi: 10.1038/srep19103

119. Zeng, G., Yu, Y., et al. (2024). Advancing cancer research through organoid technology. *Journal of Translational Medicine*, 22(1), s. 17, Article 1007. doi: 10.1186/s12967-024-05824-1
120. Zhang, Y., Yaprntseva, M. A., et al. (2021). Modeling hypoxia facilitates cancer cell survival through downregulation of p53 expression. *CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS*, 345, s. 7, Article 109553. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109553
121. Zhao, Z., Chen, X., et al. (2022). Organoids. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), s. 46, Article 94. doi: 10.1038/s43586-022-00174-y
122. Zhou, R., Brislinger, D., et al. (2025). Vascularised organoids: Recent advances and applications in cancer research. *Clinical and Translational Medicine*, 15(3), s. 27, Article e70258. doi: 10.1002/ctm2.70258
123. Zhou, Z. L., Cong, L. L., et al. (2021). Patient-Derived Organoids in Precision Medicine: Drug Screening, Organoid-on-a-Chip and Living Organoid Biobank. *FRONTIERS IN ONCOLOGY*, 11, s. 16, Article 762184. doi: 10.3389/fonc.2021.762184
124. Živković, Z., & Opačak-Bernardi, T. (2025). An Overview on Spheroid and Organoid Models in Applied Studies. *Sci*, 7(1), s. 17, Article 27. doi: 10.3390/sci7010027