UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025 Šárka Švecová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

3D kultivační techniky pro lidské hepatocyty

Bakalářská práce

2025 Šárka Švecová

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Šárka Švecová**
Osobní číslo:	**C22256**
Studijní program:	**B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce:	**3D kultivační techniky pro lidské hepatocyty**
Téma práce anglicky:	**3D Cultivation Techniques for Human Hepatocytes**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Prostudujte aktuální vědecké publikace týkající se 3D kultivačních technik a jejich aplikací v biomedicínském výzkumu. Jasně definujte a popište jaterní tkáň, hepatocyty a další typy jaterních buněk.

2. Zpracujte přehled in vitro modelů: Poskytněte podrobný přehled různých jaterních *in vitro* modelových systémů, včetně subcelulárních frakcí, izolovaných hepatocytů, buněčných linií odvozených z karcinomu jater, a trojrozměrných modelů.

3. Popište metody přípravy 3D modelů: včetně odběru a izolace lidských primárních hepatocytů, kultivace jaterních sféroidů a organoidů. Popište metody analýzy a identifikace jaterních 3D struktur, zaměřte se na specifické markery hepatocytů, popř. nádorových jaterních buněk.

4. Diskutujte využití 3D jaterních buněčných modelů ve výzkumu a v klinických aplikacích. Zhodnoťte výhody a nevýhody jaterních sféroidů vs organoidů a perspektivy výzkumu těchto modelů. Bakalářskou práci přehledně zpracujte, použijte obrázky a schémata. Ke zpracování kompilace využijte elektronických databází, např. *NCBI Pubmed, ScienceDirect, WoS*, 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: **Mgr. Lenka Šmíd, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

L.S.

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

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

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem **3D kultivační techniky pro lidské hepatocyty** 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 18. 6. 2025

Šárka Švecová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych vyjádřila srdečné poděkování vedoucí své bakalářské práce Mgr. Lence Šmíd, Ph.D., za odborné vedení, praktické rady, trpělivost a podporu, které mi byly během celého zpracování práce velkou oporou.

Velké díky patří také mé rodině a přátelům za jejich neustálou podporu, motivaci a trpělivost po celou dobu mého studia. Bez jejich povzbuzení, cenných rad a porozumění by tato práce nevznikla.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na jaterní buňky přirozeně se vyskytující v jaterní tkáni a alternativní buněčné zdroje – kmenové buňky a buněčné linie. Hlavní důraz je kladen na 3D kultivační modely, zejména sféroidy a organoidy, přičemž jsou zmíněny i další typy 3D systémů. V závěru jsou shrnuty možnosti využití těchto modelů v rámci současných i budoucích vědeckých aplikací a jejich potenciál pro preklinické testování či regenerativní medicínu.

KLÍČOVÁ SLOVA

primární lidské hepatocyty, 3D modely, sféroidy, organoidy, kmenové buňky, modely odvozené od pacientů

TITLE

3D Cultivation Techniques for Human Hepatocytes

ANNOTATION

Bachelor thesis focuses on liver cells naturally present in hepatic tissue, as well as alternative cellular sources such as stem cells and cell lines. The main emphasis is placed on 3D culture models, particularly spheroids and organoids, while also addressing other types of 3D systems. The final part summarizes the potential applications of these models in current and future research, including their relevance for preclinical testing and regenerative medicine.

KEYWORDS

primary human hepatocytes, 3D models, spheroids, organoids, stem cells, patient-derived models

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ **9**
SEZNAM TABULEK **10**
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK **11**
Úvod **12**
1. Charakteristika jaterní tkáně **13**
1.1 Fyziologie jater 13
1.2 Jaterní populace 16
1.2.1 Hepatocyty 17
1.2.2 Neparenchymální buňky 19
1.2.3 Subcelulární frakce 23
2. Buněčné modely jater **24**
2.1 Imortalizované nebo nádorové modely 24
2.1.1 HepG2 25
2.1.2 Huh7 25
2.1.3 Hep3B 26
2.1.4 HepaRG 27
2.2 Modely diferencované z pluripotentních kmenových buněk 28
2.2.1 Indukované pluripotentní kmenové buňky 28
2.2.2 Endoteliální buňky lidské pupečníkové žíly 29
2.2.3 Buňky podobné hepatocytům 29
2.3 Primární 3D nádorové modely 31
2.3.1 Nádorové sféroidy 31
2.3.2 Nádorové organoidy 32
3. Přehled 3D modelů a metod přípravy **33**
3.1 Současné 3D modely 33
3.1.1 Statické 3D modely 34
3.1.2 Dynamické 3D modely 35
3.2 Izolace a charakteristika primárních lidských hepatocytů 36
3.2.1 Mechanické metody izolace 37
3.2.2 Enzymatické metody izolace 37
3.3 Charakterizace izolovaných lidských buněk 39
3.3.1 Metody pro charakterizaci 39
3.3.2 Charakterizace primárních lidských hepatocytů 42

3.3.3 Hepatocyty připravené technologií Upcyte 43
3.4 Média využívaná pro kultivaci hepatocytů 44
4. Sféroidy 45
4.1 Sféroidy z imortalizovaných linií 45
4.2 Sféroidy z primárních lidských hepatocytů 46
4.2.1 Inovace sféroidů z primárních lidských hepatocytů 47
4.2.2 Využití sféroidů 47
4.3 Pacientské sféroidy 48
5. Organoidy 51
5.1 Organoidy z imortalizovaných buněk 52
5.2 Organoidy z kmenových buněk 53
5.3 Pacientské organoidy 54
6. Využití 3D modelů 56
6.1 Testování toxicity léků 56
6.2 Buněčná terapie 57
Závěr 60
POUŽITÁ LITERATURA 61
SEZNAM PŘÍLOH 68
PŘÍLOHY 69

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Strukturní a funkční jednotky jater 13
Obrázek 2. Histologický řez játry 14
Obrázek 3. Zobrazení morfologie jaterních buněk ve 3D *in silico* 15
Obrázek 4. A – jaterní lalůček, B – jaterní acinus 16
Obrázek 5. Sféroidy z PHH a v kokultivaci s NPC 22
Obrázek 6. Generování pacientského nádorového sféroidu 32
Obrázek 7. Schéma personifikované terapie organoidy 32
Obrázek 8. Přehled 2D a 3D kultivačních modelů 34
Obrázek 9. Izolace jaterních buněk 38
Obrázek 10. Imunofluorescenční barvení a fázový kontrast jaterních buněk bez Percollu a s Percollem.....39
Obrázek 11. Vzhled buněk po izolaci a separaci pod fázovým kontrastem 39
Obrázek 12. Morfologický vzhled adherentních jaterních buněk ve fázovém kontrastu a imunofluorescenční barvení buněčných typově specifických antigenů 40
Obrázek 13. Techniky pro charakterizaci hepatocytů 42
Obrázek 14. Generování kokultivovaných sféroidů 46
Obrázek 15. Imunohistochemické barvení kokultivovaných sféroidů 47
Obrázek 16. Role séra při tvorbě pacientských nádorových sféroidů 49
Obrázek 17. Zobrazení heterogenity nádorových sféroidů 50
Obrázek 18. Porovnání tvorby organoidů u nádorových linií 53

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Markery hepatocytů 18
Tabulka 2. Markery Kupfferových buněk 20
Tabulka 3. Markery jaterních hvězdicovitých buněk 20
Tabulka 4. Markery jaterních endoteliálních buněk 21
Tabulka 5. Markery cholangiocytů 22
Tabulka 6. Buňky podobné hepatocytům v databázi HLCompR 31

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADME	absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace
ATP	adenosintrifosfát
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EpCAM	adhezní molekula epiteliálních buněk
FBS	fetální bovinní sérum
HCC	hepatocelulární karcinom
hCdHOs	lidské chemicky indukované jaterní progenitorové buňky
HLC	hepatocytům podobné buňky
HNF4A	hepatocytární jaderný faktor alfa
HSC	jaterní hvězdicovité buňky
HUVEC	endoteliální buňky lidské pupečníkové žíly
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky
iPSC-Heps	hepatocyty odvozené z pluripotentních kmenových buněk
KRT	keratin
NGS	sekvenování nové generace
NPC	neparenchymální buňky
PAN-CK	pancytokeratin
PCLS	přesně řezané plátky jater
PHH	primární lidské hepatocyty
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
RNA	ribonukleová kyselina

Úvod

Játra jsou zásadním orgánem, který se podílí na metabolismu živin, detoxikaci, syntéze bílkovin a udržování homeostázy. Komplexní architektura jaterní tkáně, její buněčná různorodost a schopnost regenerace, z ní činí velkou výzvu pro laboratorní modelování. Běžně používané 2D modely nejsou schopny plně napodobit fyziologické podmínky *in vivo*, především buněčné interakce, polaritu a funkční stabilitu. Tyto limity vedly k rozvoji 3D kultivačních systémů, které poskytují realističtější mikroprostředí, a umožňují dlouhodobější zachování jaterních funkcí.

Význam 3D modelů zároveň podporuje i rostoucí potřeba efektivnějších náhrad jaterních funkcí, zejména s ohledem na zvyšující se počet pacientů indikovaných k transplantaci jater. Nedostatek vhodných dárcovských orgánů, vysoká finanční náročnost zákroku a potřeba imunologické kompatibility zvýrazňují potřebu alternativních přístupů, včetně *in vitro* modelů využitelných jak pro výzkum, tak potenciálně i pro terapeutické účely.

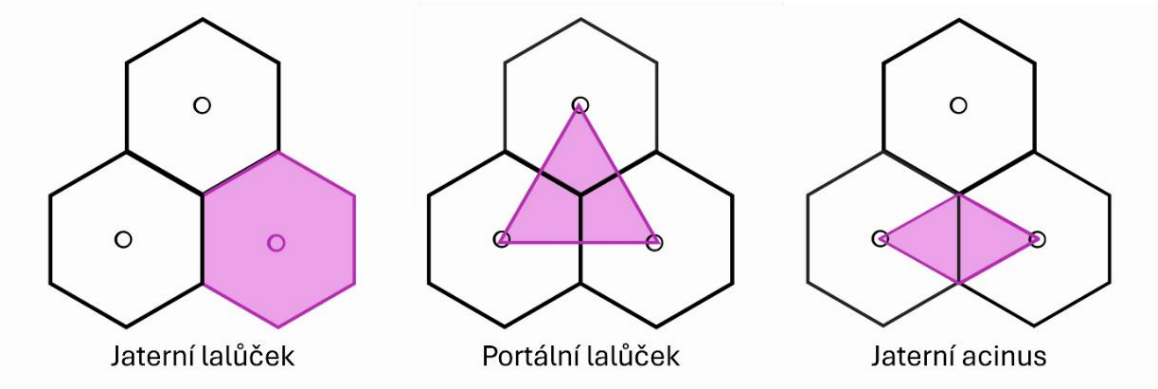
Práce se zaměřuje na buněčné zdroje používané pro tvorbu 3D jaterních modelů – především sféroidů a organoidů. Hlavní pozornost je věnována primárním lidským hepatocytům, ale také buněčným liniím a kmenovým buňkám, které představují alternativní řešení tam, kde je použití primárních buněk omezené. Práce shrnuje výhody a nevýhody jednotlivých přístupů a jejich využití v současném i budoucím výzkumu.

1. Charakteristika jaterní tkáně

1.1 Fyziologie jater

Játra jsou klíčovým orgánem lidského těla, který hraje roli v mnoha metabolických procesech, včetně zpracování léků, živin, detoxikaci a trávení. V případě poškození mají játra pozoruhodnou schopnost rychlé regenerace a mohou se navrátit do původní velikosti, pokud je příčina poškození včas odstraněna.

Hlavní bariéru pro sloučeniny vstupující do systémového oběhu z gastrointestinálního traktu představují játra. Disponují vysokou metabolickou kapacitou pro přeměnu těchto látek, což se označuje jako metabolismus prvního průchodu, a podílejí se na jejich vylučování žlučovými cestami. Krev ze střeva, slinivky a sleziny vstupuje do jater portální žílou, kde se mísí s krví přiváděnou jaterní tepnou, a poté proudí přes hustou síť sinusoid směrem k centrální žíle. Naopak žluč se pohybuje obráceným směrem sítí žlučových kanálků. Prostor mezi portální a centrální žílou je vyplněn převážně hepatocyty a dalšími neparenchymálními buňkami. Hepatocyty, jako hlavní funkční buňky jater, zajišťují zpracování krve a vylučování žluči do žlučových kanálků, které jsou vloženy mezi sinusové endoteliální buňky a propojeny s okolními hepatocyty. Díky tomu vytvářejí trojrozměrnou síť pro efektivní výměnu molekul mezi krevním a žlučovým systémem. Anatomicky jsou lidská játra rozdělena na dva laloky (levý a pravý) obsahující obrovské množství strukturních jednotek – jaterních lalůčků viz Obrázek 1.



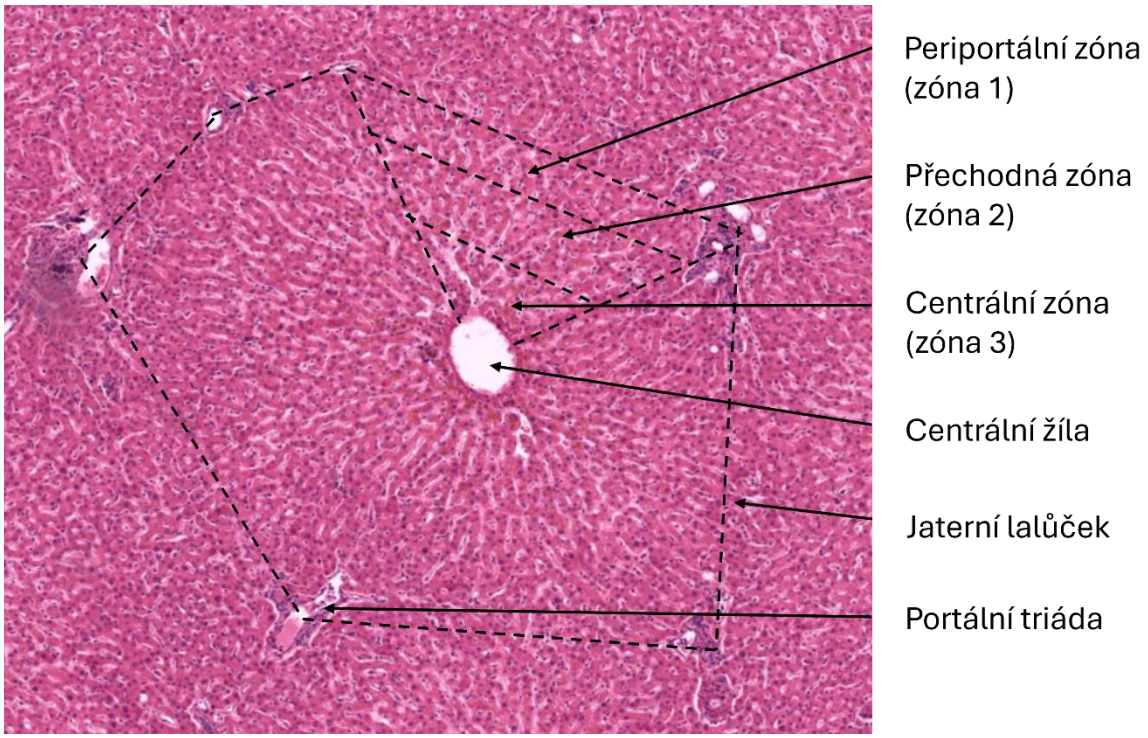
Obrázek 1. Strukturní a funkční jednotky jater (vlastní tvorba autora)

Tyto strukturní jednotky mají šestihranný tvar, s portálními triádami v rozích (větev portální žíly, jaterní tepny a žlučového vývodu) a centrální žílou uprostřed. Portální lalůček se vyznačuje tvarem trojúhelníku a spojuje 3 centrální žíly s portální triádou ve středu. Sinusoidy, tedy kapiláry s vysokou propustností, propojují cévy triád s centrální žílou. V nich se mísí okysličená krev z jaterní tepny s krví bohatou na živiny přiváděnou portální žílou. Díky poréznímu endotelu se živiny a kyslík efektivně dostávají k hepatocytům, které lemují

sinusoidy. V důsledku spotřeby kyslíku vzniká napříč lalůčkem kyslíkový gradient, který umožňuje identifikovat metabolicky odlišné zóny. Jaterní acinus má kosočtvercový tvar a dělí se na tři zóny viz Obrázek 2.:

- Zóna 1 (periportální) je nejblíže k portální triádě, takže obsahuje nejvíce kyslíku a živin, hepatocyty jsou velmi aktivní;
- Zóna 2 je přechodná oblast mezi zónou 1 a 3, jsou zde kombinovány funkce obou zón a hepatocyty se přizpůsobují;
- Zóna 3 je nejblíže k centrální žíle, má nejmenší koncentraci kyslíku a je nejcitlivější na hypoxii a toxiny.

Všechny uvedené vlastnosti je potřeba zahrnout také do tvorby 3D modelů, aby byly metabolicky kompetentní. (Cox et al., 2020)



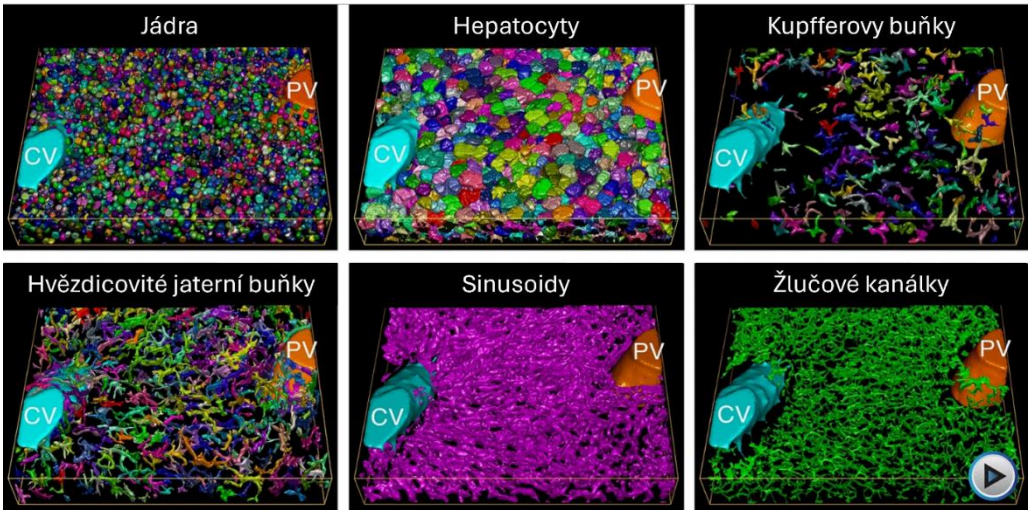
Obrázek 2. Histologický řez játry (Sorenson et al., 2025 (histologický atlas); vlastní tvorba autora)

Játra jsou pokryta tenkým pouzdrem z husté pojivové tkáně, které proniká do parenchymu a vytváří jemné retikulární lešení, jež rozděluje orgán na 500 tisíc až 1 milion šestihranných lalůčků. Histologický řez játry nabízí pohled na jejich strukturu. Každý lalůček má ve svém středu centrální žílu, kolem níž jsou radiálně uspořádány laminy hepatocytů. Játra tvoří různorodá populace buněk, zahrnující hepatocyty, sinusoidální endotelové buňky, jaterní hvězdicovité buňky, Kupfferovy buňky, žlučové epiteliální buňky a dendritické buňky. Zachování polarity hepatocytů je klíčové pro správnou funkci jater i při kultivaci *in vitro*. Díky specifickému architektonickému uspořádání a heterogenitě buněčných typů jsou jaterní

buňky vystaveny gradientům živin, hormonů a růstových faktorů, které přicházejí kombinovaným přívodem krve z portální žíly a jaterní tepny. (Yang et al., 2022)

Mezi akutní poškození jater patří traumatické ruptury, virová hepatitida A a požití hepatotoxických látek. Při chronickém poškození jater, které může být způsobeno např. hepatitidou B, autoimunitními či genetickými poruchami, nadměrným užíváním alkoholu, léky nebo jinými běžnými jaterními onemocněními (hemangiomy, traumatické léze, hepatocelulární karcinom a cirhóza) dochází k postupnému zhoršování funkce jater. Cirhóza navíc často předchází rozvoji rakoviny jater a představuje jednu z hlavních příčin úmrtí na jaterní onemocnění po celém světě. Přetrvávající škodlivé vlivy oslabují regenerační kapacitu a to může vést k postupnému selhávání jaterních funkcí. Diagnostika zahrnuje laboratorní testy a zobrazovací metody. Léčba se liší podle stádia onemocnění, v některých případech je nezbytná transplantace. Jaterní sféroidy jsou jednoduché 3D modely přinášející lepší možnosti pro testování hepatotoxicity než 2D modely. Jaterní organoidy jsou 3D struktury, které napodobují jaterní tkáň a představují slibný model pro výzkum nebo regenerativní medicínu. (Gong et al., 2025) Kvůli trvalému nedostatku vhodných dárcovských orgánů nabývá na významu právě kultivace jaterní tkáně *in vitro*, a to jak pro účely regenerativní medicíny, tak pro testování hepatotoxicity léků. (Yang et al., 2022)

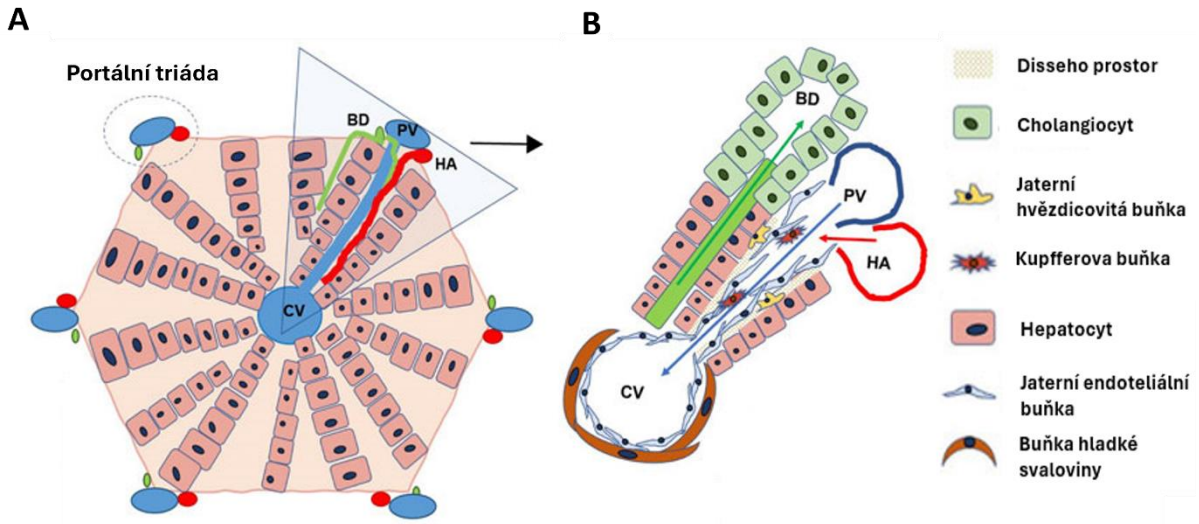
Mezi nové metody zobrazení jater patří fenotypová charakterizace heterogenity jaterní tkáně pomocí 3D jednobuněčného atlasu nové generace *in silico*, který věrně simuluje rozložení jaterních buněk, je účinným nástrojem pro kvantifikaci složitých tkáňových vlastností a zkoumá vztahy mezi strukturou a funkcí. Viz Obrázek 3. zobrazení jaterních buněk ve 3D ukazuje, jak jsou fyziologicky poskládané v jaterní tkáni, což umožňuje další pohled na tyto struktury a komplexní propojení informací. (Martínez-Torres et al., 2024)



Obrázek 3. Zobrazení morfologie jaterních buněk ve 3D in silico (převzato a upraveno dle Martínez-Torres et al., 2024)
CV – centrální žíla, PV – portální žíla

1.2 Jaterní populace

Játra obsahují mnoho buněk, které mají své specifické vlastnosti a funkce. Pro přehled je zde uvedeno schéma, které jaterní populace přibližuje viz Obrázek 4.



Obrázek 4. A – jaterní lalůček, B – jaterní acinus (převzato a upraveno dle Xu, 2021)
BD – žlučový kanálek, CV – centrální žíla, HA – jaterní tepna, PV – portální žíla

Jaterní buňky jsou velmi rozmanité a mají důležité funkce pro organismus. V následujících podkapitolách jsou představeny nejen specifické buňky pro jaterní tkáň, ale i zdroje buněk pro kultivaci a modelování *in vitro* systémů. Součástí jejich charakteristiky jsou i typické markery viz Tabulka 1., Tabulka 2., Tabulka 3., Tabulka 4. a Tabulka 5., které se sledují při testování *in vitro* modelů, aby byla zajištěna jejich správná identifikace. Kompletní seznam markerů viz Příloha A. Vzhledem k tomu, že tato práce se zabývá především primárními lidskými hepatocyty (PHH), bude jim věnována samostatná kapitola.

„Databáze ScType je dosud největší databáze markerů specifických pro lidské a myší buňky, sestavená integrací informací dostupných v databázích CellMarker (Zhang et al., 2018) a PanglaoDB (Frazén et al., 2019), což jsou v současné době dvě nejdostupnější databáze specifických buněčných znaků. V databázi CellMarker bylo ručně shromážděno a vybráno 13605 buněčných markerů pro 467 typů buněk ve 158 lidských tkáních/subtkáních a 9148 tvůrců buněk pro 389 typů buněk v 81 myších tkáních/subtkáních z více než 100000 publikovaných článků. V PanglaoDB bylo identifikováno 6631 genových markerů mapujících se na 155 typů buněk pomocí diferenciální exprese v konkrétních typech buněk pomocí jednobuněčných dat a komunitního „crowdsourcingového“ přístupu (tj. metoda sběru dat, na kterém se podílí širší veřejnost a řeší zadaný úkol) pro kurátorství markerů genové exprese.“ (Ianevski et al., 2022)

1.2.1 Hepatocyty

Hepatocyty jsou epiteliální parenchymální buňky jater, které mají polyedrický tvar a běžně obsahují jedno až dvě jádra. Fyziologicky tvoří v játrech trámce a jsou uspořádány tak, že venózní pól směřuje k centrální žíle, zatímco apikální plochy tvoří kanálky pro sběr a transport žluči a žlučových solí, čehož je potřeba dosáhnout i ve 3D modelech. (Peng et al., 2022) Již mnoho let je známo, že hepatocyty tvoří 60 % jaterních buněk a 80 % jaterního objemu. (Malarkey et al., 2005)

Plazmatická membrána hepatocytu je rozdělena do tří funkčně odlišných domén: sinusoidální, laterální a kanalikulární. Tyto domény jsou odděleny těsnými spoji (tight junctions), přičemž laterální membrána obsahuje i desmozomy a mezerové spoje (gap junctions), které zajišťují mezibuněčnou komunikaci. Sinusoidální membrána hepatocytu směřuje k sinusoidám (krevním vlásečnicím) a Disseho prostoru, má mikroklky o délce cca 0,5 μm, které mohou pronikat fenestracemi endotelu do lumen sinusoid a podílejí se na absorpci a sekreci. V oblasti mikroklků se nacházejí struktury zodpovědné za selektivní endocytózu. Laterální povrch hepatocytů je nepravidelný, obsahuje mezibuněčné spoje a je hlavním místem komunikace a přenosu malých molekul. Kanalikulární část je místem vzniku žlučového kanálku, který vzniká spojením půlkanálků dvou sousedních hepatocytů. Vnitřní lumen je pokrytý mikroklky, čímž se zvětšuje plocha a je usnadněná sekrece žluči. Jádro hepatocytu zaujímá 5–10 % objemu buňky, má kulovitý tvar, rozptýlený euchromatin a může mít zřetelná jadérka při regeneraci. U dospělých je přibližně 25 % buněk binukleárních a část má tetraploidní jádra. Jejich podíl roste s věkem, zatímco novorozenecké hepatocyty jsou většinou mononukleární a diploidní. Mitotická aktivita je významná v období vývoje, ale v dospělosti výrazně klesá. (Carotti et al., 2020)

Hepatocyty hrají klíčovou roli ve vychytávání a vylučování látek z krve a do krve, stejně jako v eliminaci sloučenin do žluči (např. toxické metabolity, žlučové kyseliny, bilirubin). Kromě toho mají řadu dalších funkcí, včetně detoxikace amoniaku, ukládání energie (glykogen), produkce energetických prekurzorů (pyruvát, glukóza, acetyl-CoA), syntézy cholesterolu, žlučových kyselin a ketolátek, metabolismu lipoproteinů a produkce sérových proteinů (albumin, koagulační faktory). Funkce hepatocytů závisí na jejich umístění v lalůčku viz rozdělení výše – zóna 1 je specializována na syntézu cholesterolu, oxidaci mastných kyselin a glukoneogenezi, zóna 3 se podílí na syntéze žlučových kyselin, lipogenezi a biotransformaci pomocí cytochromu P450 (CYP). (Cox et al., 2020)

Lze je také rozpoznat díky expresi specifických markerů, např. pancytokeratin (PAN-CK), intermediární filament keratin 18 (KRT18) a hepatocytární jaderný faktor alfa (HNF4A). Jsou zodpovědné za produkci albuminu, α-makroglobulinu a transthyretinu, a hrají klíčovou roli v detoxikaci díky enzymům – cytochrom CYP4E3. Tyto látky lze detekovat pomocí qRT-PCR, enzymatických testů nebo western blotu. V rámci metabolických procesů hepatocytů jsou důležité enzymy ze skupiny cytochromů P450, např. CYP3E1, jehož hladina se zvyšuje při stresu nebo poškození jater. Tyto monoxygenázy, které se nacházejí především v játrech, oxidují různé látky a mohou produkovat cytotoxické nebo genotoxické metabolity. Metabolity pak mohou přispívat k rozvoji onemocnění, jako je alkoholová jaterní choroba. (Liu et al., 2023)

Tabulka 1. Markery hepatocytů (převzato a upraveno dle Ianevski et al., 2022)

Nejdůležitější markery hepatocytů		
ALB	albumin	hlavní protein produkovaný hepatocyty, klíčový marker pro jejich identifikaci
HNF4A	hepatocytární jaderný faktor 4 alfa	transkripční faktor nezbytný pro diferenciaci a funkci hepatocytů
ASGR1	asialoglykoproteinový receptor 1	specifický receptor hepatocytů podílející se na odbourávání glykoproteinů
CYP3E1	cytochrom P450 3E1	enzym zapojený do metabolismu xenobiotik a detoxikace v játrech
ARG1	arginása 1	klíčový enzym močovinového cyklu, marker funkčních hepatocytů

Při kultivaci primárních lidských hepatocytů v konvenčních 2D monokulturách dochází k jejich rychlé dediferenciaci a ztrátě jaterně specifických funkcí, tedy omezuje jejich využitelnost pro dlouhodobé studie. Řešením jsou 3D kultivační systémy ve formě sféroidů, v nichž lze hepatocyty dlouhodobě udržet při stabilní životaschopnosti a zachování funkcí, např. produkce albuminu, močoviny či tvorba funkčních žlučovodů. Sféroidy navíc vykazují buněčnou polaritu a morfologii podobnou *in vivo* jaterní tkáni, včetně interindividuální variability, takže umožňuje modelovat jak normální, tak patologické podmínky. Tyto kultury zůstávají funkčně stabilní po dobu nejméně 5 týdnů. (Bell et al., 2016) Přestože v dnešní době máme mnoho možností pro volbu vhodného 3D modelu, zůstávají primární lidské hepatocyty zlatým standardem v toxikologii, zejména pro regulační účely, díky zachování biotransformačních funkcí a reprezentaci mezilidské variability. Jejich využití ve sféroidech je však omezeno na dobu cca 5 týdnů, tudíž nepostačuje pro výzkum chronické toxicity. Vzhledem k tomu, že mechanismy akutní a chronické toxicity se výrazně liší, je nezbytné vyvíjet dlouhodobě udržitelné modely lidských jaterních buněk pro hodnocení účinků léčiv. (Rebelo et al., 2015;

Kanebratt et al., 2021) Aktuálně jsou používané kokultivované sféroidy z PHH a neparenchymálních buněk, které vykazují lepší vlastnosti a morfologii. Kvůli nedostatku čerstvé jaterní tkáně jsou zkoumány i jiné zdroje buněk, ze kterých se hepatocyty vyvíjejí. (Kim et al., 2024)

Primární lidské hepatocyty jsou v 3D sféroidech nejlepší volbou pro studium metabolismu (CYP enzymy), farmakokinetiky a toxikologie, protože nejlépe zachovávají enzymatické profily dospělé jaterní tkáně. (Bell et al., 2016; Cox et al., 2020; Kanebratt et al., 2021) Na druhou stranu organoidy pouze z primárních lidských hepatocytů jsou poměrně vzácné. (Tong et al., 2024)

1.2.2 Neparenchymální buňky

Neparenchymální buňky (NPC) tvoří v játrech zbývajících 40 % a řadí se sem Kupfferovy buňky, jaterní hvězdicovité buňky, jaterní endoteliální buňky a cholangiocyty. (Cox et al., 2020) Lymfoidní frakce, tvořená NK buňkami, T-lymfocyty, B-lymfocyty a dalšími imunitními buňkami, patří také mezi neparenchymální buňky jater a podílí se na imunitním dozoru, regulaci zánětu a udržení imunologické tolerance. Jejich role zatím ve využití ve 3D modelech není zaznamenána, takže jim nebude věnována samostatná podkapitola. (Carotti et al., 2020)

1.2.2.1 Kupfferovy buňky

Kupfferovy buňky mají nepravidelný, hvězdicovitý nebo améboidní tvar, který jim umožňuje rozprostření podél stěn jaterních sinusoid. Jejich jádro je oválné nebo ledvinovité a obsahuje euchromatin svědčící o aktivní transkripci. Cytoplazma je bohatá na fagolysozomy, které obsahují pohlcené částice – patogeny nebo zbytky erytrocytů. (Cox et al., 2020) Kupfferovy buňky pocházejí z embryonálního žloutkového váčku a tvoří rezidentní makrofágovou populaci jater – 80 % všech makrofágů se nachází v játrech. V klidových podmínkách se samy obnovují bez přítoku monocytů z krve. Markery se používají CD68 a nověji CD163L. Při poškození jater dochází k rekrutaci monocytů z krevního oběhu, které doplňují a remodelují existující makrofágovou populaci. Kupfferovy buňky, rezidentní makrofágy jater, hrají klíčovou roli v imunitní homeostáze i patologii – produkují protizánětlivé cytokiny (např. IL-10), exprimují MHC II molekuly a působí jako antigen-prezentující buňky, čímž podporují adaptivní imunitní odpověď. Kromě toho likvidují stárnoucí erytrocyty a degradují hem na bilirubin, který je dále metabolizován hepatocyty. Jejich povrch je pokryt mikroklky a výběžky, které zvyšují efektivitu fagocytózy. Interakcí s hvězdicovitými buňkami

se podílejí na regulaci regenerace jaterní tkáně i rozvoji fibrózy a svou sekreční aktivitou se účastní prozánětlivých i imunoregulačních procesů. (Carotti et al., 2020; Cox et al., 2020)

Tabulka 2. Markery Kupfferových buněk (převzato a upraveno dle Ianevski et al., 2022)

Nejdůležitější markery Kupfferových buněk		
CLEC4F	člen F rodiny lektinových domén typu C4	specifický marker Kupfferových buněk, který se používá k jejich identifikaci
CD68	diferenciační skupina 68	marker makrofágů, široce exprimovaný v Kupfferových buňkách
MARCO	makrofágový receptor s kolagenní strukturou	scavenger receptor zapojený do fagocytózy patogenů a odstraňování odpadních částic
CD163	diferenciační skupina 163	receptor pro hemoglobin-haptoglobinové komplexy, důležitý pro odbourávání hemu
VSIG4	protein obsahující V-set a imunoglobulinovou doménu 4	inhibiční receptor, který hraje roli v regulaci imunitní odpovědi a je specifický pro Kupfferovy buňky

1.2.2.2 Jaterní hvězdicovité buňky

Jaterní hvězdicovité buňky (HSC) tvoří 5–8 % jaterních buněk a nacházejí se v Disseho prostoru mezi hepatocyty a sinusoidami. Ukládají vitamín A a podílejí se na regulaci průtoku krve. Při poškození jater se mohou přeměnit na myofibroblasty produkující extracelulární matrix (ECM) a prozánětlivé cytokiny podporující fibrózu. Nadměrná remodelace ECM a úbytek jaterních buněk mohou vést k jaterní cirhóze a selhání jater. (Cox et al., 2020) Morfologicky vykazují málo drsného endoplazmatického retikula a malý Golgiho aparát. Histologicky lze aktivaci sledovat změnou v markerové expresi (např. GFAP, reelin, α-SMA). (Carotti et al., 2020)

Tabulka 3. Markery jaterních hvězdicovitých buněk (převzato a upraveno dle Ianevski et al., 2022)

Nejdůležitější markery jaterních hvězdicovitých buněk		
ACTA2 α-SMA	aktin alfa 2 hladké svalstvo	kóduje α-hladký svalový aktin (α-SMA), hlavní marker aktivovaných hvězdicovitých buněk
COL1A1	kolagen typu I alfa 1 doména	kóduje kolagen typu I, hlavní složku extracelulární matrix
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein	marker klidových HSC, které ukládají vitamin A
PDGFRA	receptor růstového faktoru alfa krevních destiček	receptor pro PDGF, který podporuje proliferaci HSC
RBP1	retinol vázající protein 1	kóduje retinol vázající protein 1, který je důležitý pro ukládání vitaminu A v klidových HSC

1.2.2.3 Jaterní endoteliální buňky

Sinusoidální stěnu jater tvoří ploché endotelové buňky s četnými fenestracemi (otvory), které umožňují volný průchod látek mezi krví a hepatocyty. Tyto buňky nevytvářejí bazální membránu, jsou vysoce propustné a podílejí se na endocytóze i parakrinní regulaci jaterní regenerace, zánětu a fibrotizaci prostřednictvím cytokinů a růstových faktorů. (Carotti et al., 2020) Sinusové endoteliální buňky tvoří propustnou bariéru mezi krevním oběhem a jaterní tkání a hrají klíčovou roli v regeneraci jater po poškození. (Wesley et al., 2022)

Tabulka 4. Markery jaterních endoteliálních buněk (převzato a upraveno dle Ianevski et al., 2022)

Nejdůležitější markery jaterních endoteliálních buněk		
PECAM-1 (CD31)	adhezní molekula krevních destiček a endoteliálních buněk	hlavní marker endoteliálních buněk, podílí se na mezibuněčné adhezi a angiogenezi
STAB1	stabilin-1	podílí se na endocytóze a odstranění starých buněk a proteinů z krevního řečiště
VWF	Von Willebrandův faktor	protein podílející se na srážení krve
CLEC4G	člen G rodiny lektinových domén typu C4	specifický marker jaterních sinusoidálních endoteliálních buněk, podílí se na imunitní toleranci
CD34	diferenciační skupina 34	marker endoteliálních progenitorových buněk

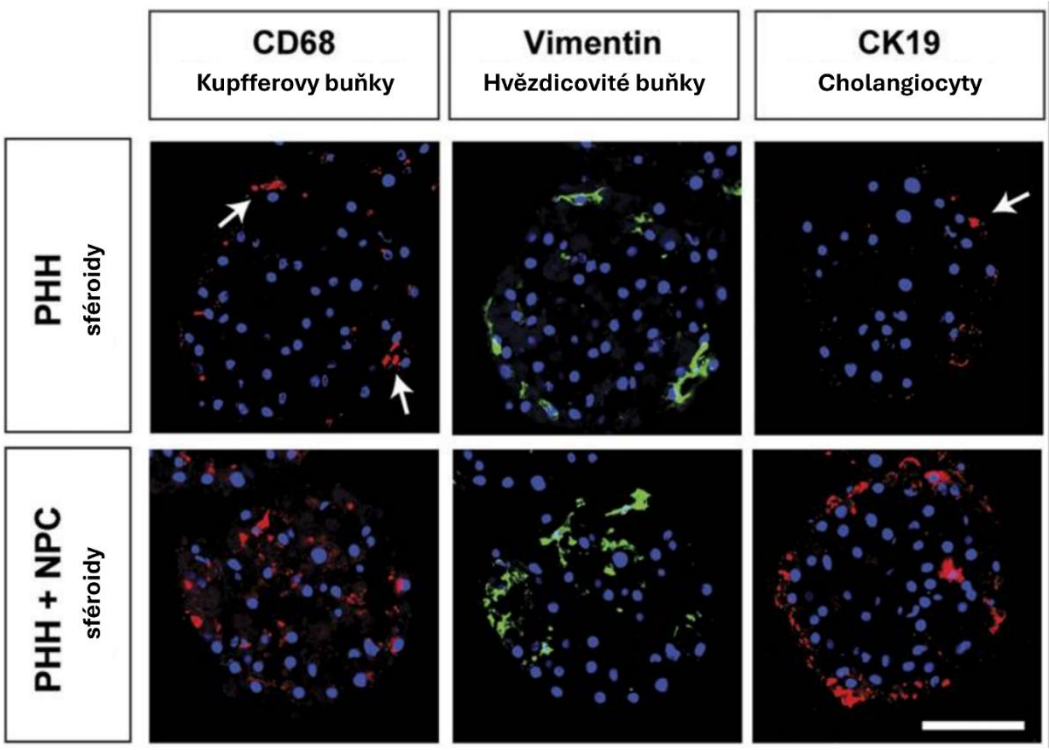
1.2.2.4 Cholangiocyty

Cholangiocyty jsou epiteliální buňky vystýlající intrahepatální a extrahepatální žlučové cesty, tvoří přibližně 35 % jaterních buněk. Histologicky se dělí na malé a velké cholangiocyty, jejich velikost koreluje s průměrem vývodu, který vystýlají. Oba typy exprimují cytokeratin CK19. Na ultrastrukturální úrovni jsou cholangiocyty vybaveny prominentním Golgiho aparátem, krátkými mikroklky, četnými cytoplazmatickými váčky a bazální membránou. Histologicky tvoří jednovrstevný kubický nebo cylindrický epitel podle velikosti vývodu, a podílí se na sekreci i reabsorpci látek ze žluči. (Carotti et al., 2020) Cholangiocyty regulují vylučování žluči úpravou jejího pH, složení a objemu. Zajišťují i zpětné vstřebávání složek (např. glukóza, aminokyseliny a ionty). (Cox et al., 2020) Jsou důležité při regeneraci chronického poškození jater. (Wesley et al., 2022)

Tabulka 5. Markery cholangiocytů (převzato a upraveno dle Ianevski et al., 2022)

Nejdůležitější markery cholangiocytů		
KRT19	keratin 19	specifický marker cholangiocytů, důležitý pro cytoskelet a strukturální integritu epitelu žlučových cest
EpCAM	adhezní molekula epiteliálních buněk	marker epiteliálních buněk, podílí se na mezibuněčné adhezi a regeneraci žlučovodů
CFTR	regulátor transmembránové vodivosti u cystické fibrózy	iontový kanál, který reguluje sekreci chloridů a hydrogenuhličitanů do žluči
SOX9	transkripční faktor 9	iontový kanál, který reguluje sekreci chloridů a hydrogenuhličitanů do žluči
AQP1	aquaporin 1	vodní kanál, který reguluje transport vody přes membrány cholangiocytů, podílí se na modifikaci složení žluči

Kultivační podmínky sféroidních modelů umožňují kokultivaci PHH s neparenchymálními buňkami jater, jmenovitě cholangiocyty, hvězdicovité buňky a Kupfferovy buňky, čímž dochází k vytvoření komplexnějšího a fyziologičtějšího jaterního mikroprostředí viz Obrázek 5. Takové systémy podporují dlouhodobou životaschopnost všech buněčných typů a zároveň umožňují modelování jaterních onemocnění (steatóza, cholestáza či virová hepatitida). Také se ukázalo, že sféroidy jsou schopny predikovat chronickou lékovou toxicitu, což z nich činí cenný nástroj pro preklinické testování. (Bell et al., 2016)



Obrázek 5. Sféroidy z PHH a v kokultivaci s NPC (Bell et al., 2016)

1.2.3 Subcelulární frakce

Subcelulární frakce se vztahuje k izolovaným organelám nebo membránovým strukturám jaterních buněk, které se získávají pomocí diferenciální centrifugace. Mezi výhody využití patří především zvýšení přesnosti analýz díky čistším suspenzím buněk, také subcelulární frakce umožňují detailní porozumění funkcím a interakcím v buňkách a podporují tvorbu virtuálních 3D modelů. Na základě poznatků jsou poté vyvíjeny 3D modely *in silico*, které věrně kopírují vzhled a morfologii již nasnímaných sféroidů a organoidů. Poté jsou schopné modelovat 3D struktury ze sesbíraných dat. Metoda SimuCell3D dokáže simulovat mechaniku tkáně s polarizací buněk, což je velmi žádané. (Runser et al., 2024)

Pro oddělení buněk z odebrané tkáně lze využít především mechanické způsoby. Je důležité zvolit vhodný postup, při kterém se organely buňky neporuší a díky různé velikosti a hustotě od sebe půjdou lépe oddělit. Frakcionace docílíme preparativní ultracentrifugací, resuspendací a dalším odstřeďováním. Subcelulární frakcionace je biologická technika, která se používá pro oddělení různých buněčných organel, ale zachovají se jejich primární funkce. (Alberts el al., 2022, str. 480)

Pokud se do laboratoře dostanou zmrazené kousky jater, je potřeba je rozmrazit, nakrájet na malé kousky a resuspendovat v homogenizačním pufru v homogenizátoru. Postupným centrifugačním peletováním je homogenát frakcionován a jednotlivé frakce jsou shromažďovány s tím, že poslední část (supernatant) je cytosol. Poté proběhne lýza proteinů, lyzáty se vyčistí odstředěním a stanoví se celkový obsah proteinů a peptidů. V první z frakcí se nachází jádra. V prostředních jsou mitochondrie, membránové frakce z Golgiho aparátu, endoplazmatické retikulum a plazmatické membrány. (Wiśniewski et al., 2016) Z jednotlivých frakcí lze modelovat struktury, které přinášejí další poznatky o konkrétních úlohách v organismu, např. mitochondriální frakce podrobněji ukazuje prostorovou distribuci mitochondriálních proteinů, a dle zaměření výzkumu lze jednotlivé frakce využít. (Kang et al., 2024)

2. Buněčné modely jater

2.1 Imortalizované nebo nádorové modely

Jaterní buněčné linie, odvozené převážně z nádorových buněk (např. HepG2, HepaRG, Huh7) se vyznačují vysokou proliferační schopností a dlouhou životností v kultuře. Díky nízké ceně, jednoduchému použití a zachování enzymových aktivit se ve výzkumu využívají častěji než biopsie jater. Všechny tyto linie mají různý počet chromozomů a mutační profil, který může ovlivnit reprodukovatelnost a interpretovatelnost výzkumů. Zároveň srovnávací transkriptomická analýza ukázala výrazné rozdíly mezi jaterními buněčnými liniemi a primárními hepatocyty, zejména v drahách regulujících buněčný cyklus – v přechodu z G1 do S fáze. Tyto rozdíly mohou ovlivnit růst, proliferaci a odpověď buněk na vnější podněty. (Arzumanian et al., 2023) Ze starších studií vyplývá, že většina z nich má změněné profily genové exprese, takže postrádají specifické jaterní funkce. Kompletní výčet genové exprese buněk HepG2, HepaRG v porovnání s PHH a kousky jaterní tkáně je viz Příloha B, ze které vyplývá, že buňky HepG2 se svým genomem nejvíce liší od ostatních testovaných buněk. Buňky HepG2 nejsou tak vhodné pro výzkum jako linie HepaRG, která má větší transkriptomickou podobnost s primárními lidskými hepatocyty při studiu metabolismu xenobiotik, hepatotoxikologie a diferenciace hepatocytů. Linie HepG2 vykazuje jiné vlastnosti metabolizace léčiv v jednotlivých třídách a liší se v celogenomové genové expresi. (Hart et al., 2010) Naopak novější studie tvrdí, že si zachovávají některé jaterní funkce, např. syntéza albuminu a aktivita cytochromu P450, a patří mezi nejslibnější kandidáty pro klinické studie umělých jater. (Yang et al., 2022) Při imunohistochemickém barvení se využívají primární protilátky, které se specificky vážou na následující antigeny a díky tomu je zvýrazňují: Ki67 (jaderné barvení), E-cadherin, vimentin, EpCAM, CD133, CD44, α-SMA, beta-katenin, CK7, CK18, CK19, CK20, AFP, A1AT a další. (Oz et al., 2021; Royo et al., 2024)

Při *in vitro* testování genotoxicity léčiv nádorové buněčné linie nabízejí řadu výhod: neomezená životnost, snadná dostupnost, jednoduchá manipulace a vysoká reprodukovatelnost výsledků díky stabilnímu fenotypu. Jejich lidský původ je dalším přínosem. Na druhou stranu vykazují i významná omezení, z nichž nejzásadnějším je nedostatečná metabolická aktivita, která může komplikovat interpretaci experimentálních dat. Naopak primární lidské hepatocyty, přestože nejlépe odrážejí *in vivo* funkce jater, mají omezenou dostupnost, krátkou životnost v kultuře a vykazují vysokou variabilitu mezi jednotlivými dárci, takže může ovlivnit konzistenci výsledků. (Štampar et al., 2024)

2.1.1 HepG2

Buněčná linie HepG2 byla odvozena z rakovinné tkáně jater 15letého bělošského muže. (ATCC, HepG2, 2025) Zajímavostí je, že téměř 30 let je tato linie chybně zařazována mezi hepatocelulární karcinom, přestože podle histologické stavby a genetického profilu se jedná o epiteliální hepatoblastom. V úložišti ATCC je zařazena jako lidská buněčná linie HB 8065 s dobře diferencovaným hepatocelulárním karcinomem, jedná se tedy o zavádějící informaci. (López-Terrada et al., 2009) Mezi markery linie HepG2, patří cytochrom P450 a jeho další poddruhy jsou exprimovány jen ve velmi nízkých hladinách specifických pro plod a není exprimován ve většině dospělých jater vůbec. To mohlo být způsobeno změnou genové exprese. (Hart et al., 2010) Analýza buněčné linie HepG2 odhalila heterogenitu v klíčových drahách spojených s mitochondriální funkcí, buněčným cyklem a metabolismem léčiv. Změny v elektronovém transportním řetězci, oxidativní fosforylaci, sestavení mitochondriálních komplexů, ribozomálních proteinech, dráze cytochromu P450 a genu pro retinoblastom ovlivňují produkci ATP, regulaci proliferace a metabolismus léčiv. Tyto rozdíly zdůrazňují nutnost opatrnosti při přenosu výsledků mezi různými buněčnými liniemi. (Arzumanian et al., 2023)

Buňky HepG2 ve srovnání s primárními hepatocyty postrádají řadu funkcí, přesto se díky své dostupnosti a snadné manipulaci běžně využívají ve studiích *in vitro*. Vykazují vyšší intermodální variabilitu (pravděpodobně v důsledku akumulace mutací způsobené nekontrolovaným buněčným dělením rakovinných buněk). (Gupta et al., 2021) Buněčná linie HepG2 se v 3D modelech – sféroidech, často využívá pro studium jaterních funkcí a toxikologie. Ve srovnání s primárními lidskými hepatocyty mají HepG2 sféroidy výhodu v dostupnosti, snadné manipulaci a reprodukovatelnosti výsledků. Nicméně PHH sféroidy lépe zachovávají fyziologické funkce jater, včetně vyšší aktivity metabolických enzymů a delší životnosti, což je činí vhodnějšími pro dlouhodobé studie farmakokinetiky a toxicity. Přestože HepG2 sféroidy nedosahují plné funkčnosti PHH, jejich využití v 3D kultivaci představuje cenný nástroj pro předběžné screeningy a mechanistické studie zejména tam, kde jsou PHH nedostupné nebo nákladné. (Yang et al., 2023)

2.1.2 Huh7

HuH-7 (dále jen Huh7) je trvalá buněčná linie vytvořena z mužské hepatomové tkáně, která byla chirurgicky odstraněna 57letému asijskému muži v roce 1982. Analýza buněčných klastrů Huh7 odhalila významné změny v metabolických drahách, syntéze a poškození DNA cholesterolu. Byly také zaznamenány změny v mitochondriální energetické produkci,

které mohou vést k dysfunkci mitochondrií a buněčné smrti. Tyto poznatky zdůrazňují funkční diverzitu buněk Huh7 a potřebu přesnosti při přenosu výsledků mezi studiemi. Z této studie také vychází, že při porovnání Huh7 a Hep3B s PHH mají vyšší míru vzájemné podobnosti nádorové linie, zatímco s HepG2 sdílejí nejméně společných znaků. (Arzumanian et al., 2023)

Studium životního cyklu viru hepatitidy C v trojrozměrných kulturách buněčné linie Huh7 v Matrigelu nabízí výhodu kombinace homogenního, snadno dostupného a geneticky dobře manipulovatelného modelu s robustní schopností replikace a produkce virionů, přičemž zároveň umožňuje zachování polarity typické pro hepatocyty a realizaci dlouhodobých experimentů. (Molina-Jimenez et al., 2012) Sféroidy a organoidy z nádorové linie Huh7 se jinak využívají jako kontrolní materiál při tvorbě pacientských nádorových 3D modelů. (Crouchet et al., 2025)

2.1.3 Hep3B

Buněčná linie Hep3B vykazuje epiteliální morfologii a byla izolována z jaterní tkáně 8letého černošského mladíka s rakovinou jater. Součástí této linie je i integrovaný genom viru hepatitidy B. (ATCC, Hep3B, 2025) Analýza buněk Hep3B odhalila narušení drah regulujících buněčný cyklus a odpověď na poškození DNA, která může přispět k rozvoji rakoviny. Mezi klastry byly zjištěny změny v expresi klíčových genů a dále byly ovlivněny metabolické dráhy kyseliny listové a vitaminu B12, což by mohlo mít dopad na buněčný metabolismus. Významné změny byly také zaznamenány v kaskádě srážení krve, přičemž tato oblast je důležitá vzhledem k zásadní roli jater v syntéze koagulačních faktorů. (Arzumainian et al., 2023)

Buňky Hep3B byly využity k vytvoření inovativního trojrozměrného modelu pro optimalizaci vysokokapacitního screeningu účinnosti protinádorových léčiv, hlavně pro hepatocelulární karcinom. (Lee et al., 2022) Sféroidní model založený na buněčné linii Hep3B lze využít pro studium interakcí mezi nádorovými a stromálními buňkami v prostředí hepatocelulárního karcinomu (HCC). Homotypické a heterotypické sféroidy (kombinované s fibroblasty) simulují nádorové mikroprostředí. Výsledky ukázaly, že přítomnost stromálních buněk nebo jejich kondicionovaného média významně podporuje proliferaci nádorových buněk. To podtrhuje význam mezibuněčné komunikace v progresi nádoru. Tento jednoduchý a nákladově efektivní 3D model nabízí cenný nástroj pro studium nádorového mikroprostředí i pro testování protinádorových terapií. (Zaki et al., 2021)

2.1.4 HepaRG

HepaRG buňky, pocházející od pacientky s hepatokarcinomem, mají schopnost diferencovat se na biliární epiteliální buňky a hepatocyty. HepaRG buňky za určitých kultivačních podmínek exprimují mnoho genů zapojených do zpracování léčiv na úrovni srovnatelné s primárními lidskými hepatocyty. Tato schopnost exprimovat a indukovat metabolizující enzymy xenobiotik je výrazně odlišná od chování často používaných buněk HepG2. Zároveň srovnání profilů genové exprese napříč chromozomy 7 a 22 s PHH neprokázaly významný rozdíl, přestože v buňkách HepaRG existuje trizomický chromozom 7. Obsah mRNA v linii HepaRG více odráží PHH a lidskou jaterní tkáň. (Hart et al., 2010) HepaRG buňky vykazují proteomický profil blízký PHH, včetně exprese hlavních jaterních transkripčních faktorů a strukturálních prvků zajišťujících biliární polaritu. Ačkoli některé mitochondriální proteiny jsou v HepaRG buňkách méně zastoupeny než v PHH, celkově představují robustní náhradu za PHH v mnoha aplikacích. Díky své vysoké diferenciaci a funkčním vlastnostem jsou HepaRG buňky vhodné pro studium metabolismu léčiv a detoxikace, hodnocení hepatotoxicity a genotoxicity, výzkum jaterních onemocnění a metabolických poruch. (Tascher et al., 2019) Podobně jako buňky HepG2 vykazují i buňky HepaRG vyšší počet nediferencovaně exprimovaných genů (non-DEG), ačkoliv stále o něco méně než HepG2. V porovnání s PHH nebo mikrotkáněmi však méně připomínají jaterní tkáň *in vivo*. Přesto některé studie naznačují, že 3D modely HepaRG mohou do určité míry napodobovat játra *in vivo*, i když tato tvrzení nejsou podpořena RNA-Seq srovnáním s lidskou jaterní tkání. (Gupta et al., 2021)

Buněčná linie HepaRG v trojrozměrných modelech nachází uplatnění jako cenná alternativa k primárním lidským hepatocytům, především v oblastech hodnocení metabolismu léčiv, genotoxicity a dlouhodobé toxicity. 3D sféroidy HepaRG vykazují stabilní sekreci albuminu a močoviny, vyšší aktivitu enzymů cytochromu P450 – CYP3A4, ve srovnání s 2D kulturami i buněčnou linií HepG2 a má fyziologičtější fenotyp. Ve srovnání s 3D modely PHH vykazují sféroidy HepaRG podobnou citlivost na hepatotoxiny, přičemž výhodou HepaRG je jejich snadnější dostupnost, nižší náklady a vyšší reprodukovatelnost mezi šaržemi. Ačkoli PHH zůstávají standardem pro studium jaterních funkcí, 3D modely HepaRG představují praktickou a spolehlivou alternativu pro dlouhodobé *in vitro* studie zejména tam, kde je omezený přístup k PHH. (Yang et al., 2023) Sféroidy z buněk HepaRG exprimují tři hlavní enzymy CYP (CYP1A2, CYP2B6 a CYP3A4) a aktivní jaterní jaderné receptory. Mají tedy schopnost bioaktivovat xenobiotika díky vysokým hladinám enzymatických aktivit CYP. Také je možné je adaptovat na kometový test, který poskytuje informaci o genotoxicitě. (Mandon et al., 2019)

Při kokultivaci s jaterními hvězdicovitými buňkami a makrofágy vznikají funkční organoidy, které lze využít pro stanovení nealkoholické ztučnění jater a pro testování hepatotoxicity léčiv. Organoidy dále vykazují vysoké hladiny exprese genů spojených s metabolismem xenobiotik fáze I a II, které zůstávají stabilní až do 14. dne kultivace, což umožňuje jejich využití ve studiích chronické expozice. Na rozdíl od dřívějších 3D systémů založených na HepaRG buňkách tento přístup využívá fyziologičtější složení. (Bronsard et al., 2024) V porovnání s jinými buněčnými liniemi hepatomu je HepaRG nejlepším náhradním modelem PHH pro metabolické aplikace a vyvíjejí se postupy pro společnou kulturu kryokonzervovaných primárních lidských hepatocytů s HepaRG v kultivačních systémech s míchanými bioreaktory. (Arez et al., 2025)

2.2 Modely diferencované z pluripotentních kmenových buněk

2.2.1 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) vznikají umělou expresí specifických genů v nepluripotentních buňkách, čímž získávají vlastnosti přirozených kmenových buněk včetně diferenciačního potenciálu. V roce 2007 byly poprvé odvozeny z lidských buněk a mohly se začít využívat ve výzkumu a terapii. Protože pocházejí z vlastních somatických buněk pacienta, nezpůsobují imunitní reakci. Přesto mohou mít odlišné diferenciační dráhy kvůli epigenetické paměti a stále existuje riziko tvorby nádorů. (Yang et al., 2022) Indukované pluripotentní kmenové buňky mohou být generovány z jakéhokoli typu lidských buněk a poté diferencovány na hepatocyty. Lidská tkáň má unikátní schopnost, kdy se PSC mohou diferencovat do libovolného typu tkáně v těle – ektodermální, mezodermální i endodermální, kam patří také hepatocyty. Bohužel výzkumy zatím ukazují, že takto odvozené hepatocyty (iPSC-Heps) vykazují vlastnosti podobné fetálním buňkám plodu, ale ne diferencovaných hepatocytů. (Kammerer, 2021) Mezi hlavní markery přítomné na povrchu jaterních kmenových buněk patří EpCAM, E-cadherin, CD133, CD29, CK8 a CK18. Markery, které naopak nejsou vůbec exprimovány, jsou AFP, ICAM, marker dospělých jaterních buněk – CYP, hemopoetických buněk – CD45 a zároveň také na marker mezenchymálních buněk – VEGF-R a desmin. (Schmelzer et al., 2007)

Většina studií je považuje za perspektivní koncept s velkým potenciálem pro využití pro aplikace ve farmakologii, toxikologii a tkáňovém inženýrství, jelikož jejich výsledky ukazují, že iPSC-Heps mají větší podobnost s diferencovanými hepatocyty než hepatomové buněčné linie. Z pohledu celogenomové analýzy je linie HepaRG srovnatelná s iPSC-Heps, avšak podrobnější analýza genů spojených s hepatotoxicitou odhalila, že iPSC-Heps v tomto

ohledu zaostávají za HepaRG, ale zároveň vykazují lepší výsledky než ostatní hepatomové linie. (Gao et al., 2017) Oproti tomu sféroidy z iPSC-Heps zatím stojí v pozadí kvůli nejednoznačným výsledkům různých studií a pro tuto technologii zatím nejsou považovány za vhodné. (Kammerer, 2021)

2.2.2 Endoteliální buňky lidské pupečníkové žíly

Endoteliální buňky lidské pupečníkové žíly (HUVEC) jsou dle slovníku ScienceDirect definovány jako „typ buněk, které lze snadno izolovat z pupečníku a kultivovat pro studium VEGF-A. HUVEC vykazují specifickou morfologii a mohou být charakterizovány povrchovými markerovými proteiny např. PECAM-1, VE-cadherin a VWF.“ (Elsevier, HUVEC, 2025)

HUVEC buňky byly využity jako součást podpůrného mikroprostředí v 3D kokultivačním systému s cílem udržet fenotyp primárních lidských hepatocytů po delší dobu. Tyto endoteliální buňky byly integrovány do mikrofluidního systému „LiverChip“, kde byly spolu s PHH kultivovány na porézních „scaffoldech“ v recirkulujícím médiu. Přítomnost HUVEC v kokultuře napomáhala zachování funkční stability hepatocytů, která se projevila zvýšenou produkcí albuminu, vyšší metabolickou aktivitou enzymu CYP3A4 a větší odolností vůči toxickým látkám. Endoteliální interakce napodobující sinusoidní prostředí jater významně přispěly k dlouhodobému udržení diferenciovaného stavu PHH. To podtrhuje důležitost HUVEC buněk v konstrukci fyziologicky relevantních jaterních modelů *in vitro*. (Ware et al., 2018)

2.2.3 Buňky podobné hepatocytům

Diferenciační protokoly pro získání buněk podobných hepatocytům (HLC, Hepatocyte-Like Cells) vycházejí z metod vyvinutých pro diferenciaci embryonálních kmenových buněk směrem k jaternímu fenotypu. (Gandhi et al., 2024) Embryonální kmenové buňky jsou buňky získané z raného embrya nebo z primitivních pohlavních žláz a vyznačují se schopností neomezeného dělení, sebeobnovy a široké diferenciace v podmínkách *in vitro*. Díky tomu lze embryonální kmenové buňky nasměrovat k vývoji téměř všech buněčných typů v těle, včetně hepatocytů, jak v laboratorních podmínkách, tak i v živém organismu. Jejich klinické využití je však omezeno etickými otázkami a potenciálními riziky, protože embryonální kmenové buňky vykazují vysokou telomerázovou aktivitu a při aplikaci do myší mohou vést k nadměrnému množení buněk a tvorbě nádorů. Z toho důvodu zůstává zásadní výzvou zajistit, aby embryonální kmenové buňky zůstaly nediferencované během kultivace a zároveň bylo

možné je cíleně diferencovat na jaterní buňky po transplantaci. (Yang et al., 2022) Nejčastěji využívaným přístupem k indukci maturace a diferenciace HLC je použití chemických koktejlů. Tyto protokoly často zahrnují také aplikaci malých molekul (např. DMSO, kyselina valproová), různé typy kultivačních systémů (včetně sféroidů, „scaffoldů“ či organoidů) a metody genetického přeprogramování prostřednictvím transkripčních faktorů nebo mikroRNA. Úspěšná diferenciace HLC je zpravidla potvrzena detekcí exprese albuminu, schopností akumulovat glykogen, syntetizovat močovinu, metabolizovat lipidy a exprimovat enzymy cytochromu P450. Avšak v porovnání s PHH vykazují nižší expresi enzymů zapojených do metabolismu a biotransformace. Přestože bylo prokázáno, že HLC vykazují fenotypové znaky podobné zralým hepatocytům, současně byly identifikovány významné rozdíly. U HLC byla zaznamenána snížená exprese transkripčních faktorů, které hrají klíčovou roli v procesu zrání hepatocytů, ve srovnání s PHH. Tato redukovaná exprese může být jedním z faktorů přispívajících k jejich částečné nezralosti. HLC vyžadují další zrání, než mohou být použity místo PHH. Diferencované HLC by mohly být využity v jaterních modelech, pokud dosáhnou funkční úrovně srovnatelné s PHH. Společná kultivace HLC s dalšími typy buněk (jaterní sinusoidální endotelové buňky, endoteliální buňky pupečníkové žíly, tukové kmenové buňky a jaterní hvězdicové buňky ve 3D matrici) vedla ke zlepšené sekreci močoviny a albuminu, zvýšené expresi jaterních markerů, tvorbě žlučových kanálků a vyšší aktivitě CYP. Většina těchto modelů však využívá sféroidní kultury, které neodrážejí přirozenou architekturu jater, ale jsou dobře přizpůsobené podmínkám *in vitro*. (Gandhi et al., 2024)

Imortalizované jaterní linie sice představují snadno dostupný systém, ale vykazují nízkou aktivitu enzymů cytochromu P450 klíčových pro metabolismus xenobiotik. Hepatocytům podobné buňky odvozené z pluripotentních kmenových buněk představují slibnou alternativu díky neomezené dostupnosti a metabolické kompetenci, přičemž několik studií již potvrdilo jejich vhodnost pro predikci hepatotoxicity. (Rebelo et al., 2015)

Zároveň v roce 2022 byla vytvořena webová aplikace HLCompR, která umožňuje porovnávat data RNA-seq konkrétních drah tvorby HLC a možnost přidání do databáze nově odvozených buněk podobných hepatocytům. V současnosti tato aplikace obsahuje buňky, uvedené viz Tabulka 6. (Ardisasmita et al., 2022)

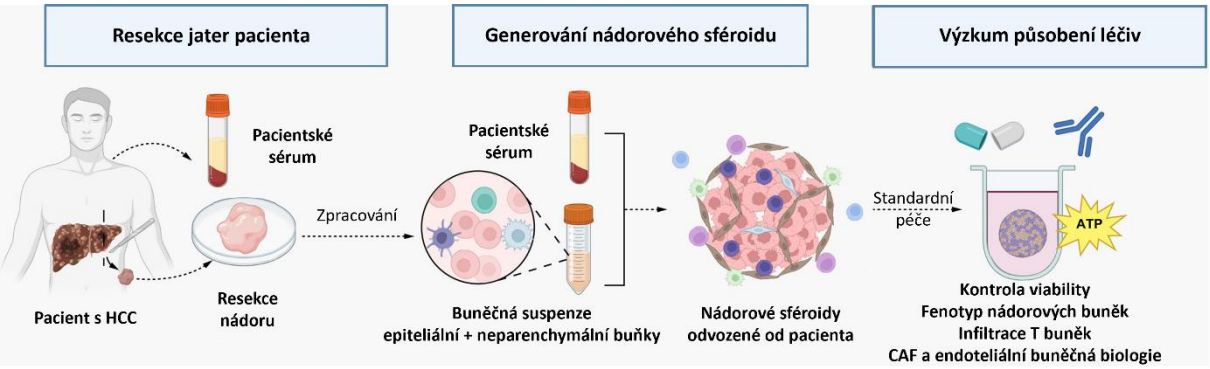
Tabulka 6. Buňky podobné hepatocytům (HLC) v databázi HLCompR (převzato dle Ardisasmita et al., 2022)

Typ	Popis
CBD	Běžná tkáň žlučovodů
Chol_HLC	Intrahepatální HLC odvozený z cholangiocytů
Fetal_Hep	Fetální hepatocyty
FHep_HLC	HLC odvozený z fetálních hepatocytů
Fib_HLC	HLC odvozený z fibroblastů
Fibroblast	Dermální fibroblasty
Hep_HLC	HLC odvozený z hepatocytů
HepG2	Buněčná linie HepG2
Játra	Jaterní tkáň
PHH	Primární lidský hepatocyt
PSC	Pluripotentní kmenové buňky (embryonální a indukované)
PSC_HLC	HLC odvozené z pluripotentních kmenových buněk

2.3 Primární 3D nádorové modely

2.3.1 Nádorové sféroidy

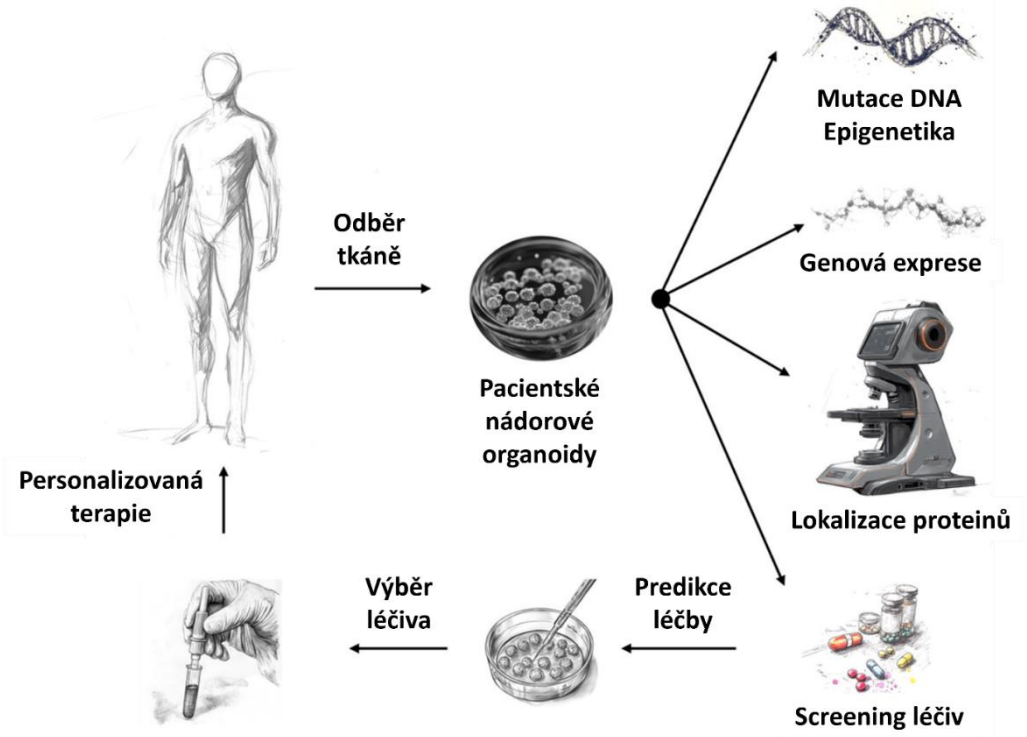
Nová studie z roku 2025 představuje model trojrozměrných sféroidů odvozených od pacientů s hepatocelulárním karcinomem, který věrně napodobuje heterogenitu nádorů a jejich mikroprostředí. Model byl vytvořen z čerstvých i kryoprezervovaných nádorových tkání a zahrnuje hlavní buněčné složky – nádorové epiteliální buňky, fibroblasty, makrofágy, T-lymfocyty a endotelové buňky viz Obrázek 6. Sféroid svou stavbou odpovídá karcinomu, ze kterého byl odvozen viz Podkapitola 4.3 podrobněji. Klíčovým prvkem pro úspěšnou tvorbu a udržení životaschopnosti sféroidů je použití autologního séra pacientů s HCC, které podporuje agregaci buněk a zachování funkčního nádorového mikroprostředí. Model umožnil testování odpovědí na schválené protinádorové léky, ale byly pozorovány rozdílné reakce mezi jednotlivými pacienty, kvůli klinické variabilitě. Tento systém představuje slibný nástroj pro vývoj léčiv a studium mechanismů účinku včetně terapií zaměřených na nádorové mikroprostředí a může přispět k personalizaci léčby HCC. (Crouchet et al., 2025)



Obrázek 6. Generování pacientského nádorového sféroidu (převzato a upraveno dle Crouchet et al., 2025)
HCC – hepatocelulární karcinom, CAF – fibroblasty asociované s rakovinou

2.3.2 Nádorové organoidy

Pokročilý model pro testování protinádorových léčiv využívající organoidy odvozené z pacientských nádorů hepatocelulárního karcinomu popisuje studie ze začátku roku 2025. Organoidy byly úspěšně kultivovány s použitím Matrigelu se sníženým množstvím růstových faktorů. Díky tomu byl jejich růst možný až po dobu 15 dnů. Organoidy vykazovaly heterogenní morfologii a byly charakterizovány pomocí zobrazení s detailním rozlišením obsahu, která zahrnovala barvení jader (Hoechst), cytoskeletálních struktur (phalloidin, α-tubulin) a detekci viability buněk. Také bylo prokázáno, že léčiva jako Ellipticin pronikají do Matrigelu a akumulují se v buňkách organoidů, což potvrzuje jejich vhodnost pro testování účinnosti protinádorových látek. Tento model nabízí reprodukovatelnou a fyziologicky relevantní platformu pro screening léčiv a podporuje personalizovaný přístup v onkologii viz Obrázek 7. (Close et al., 2025)



Obrázek 7. Schéma personifikované terapie organoidy (převzato a upraveno dle Taurin et al., 2025)

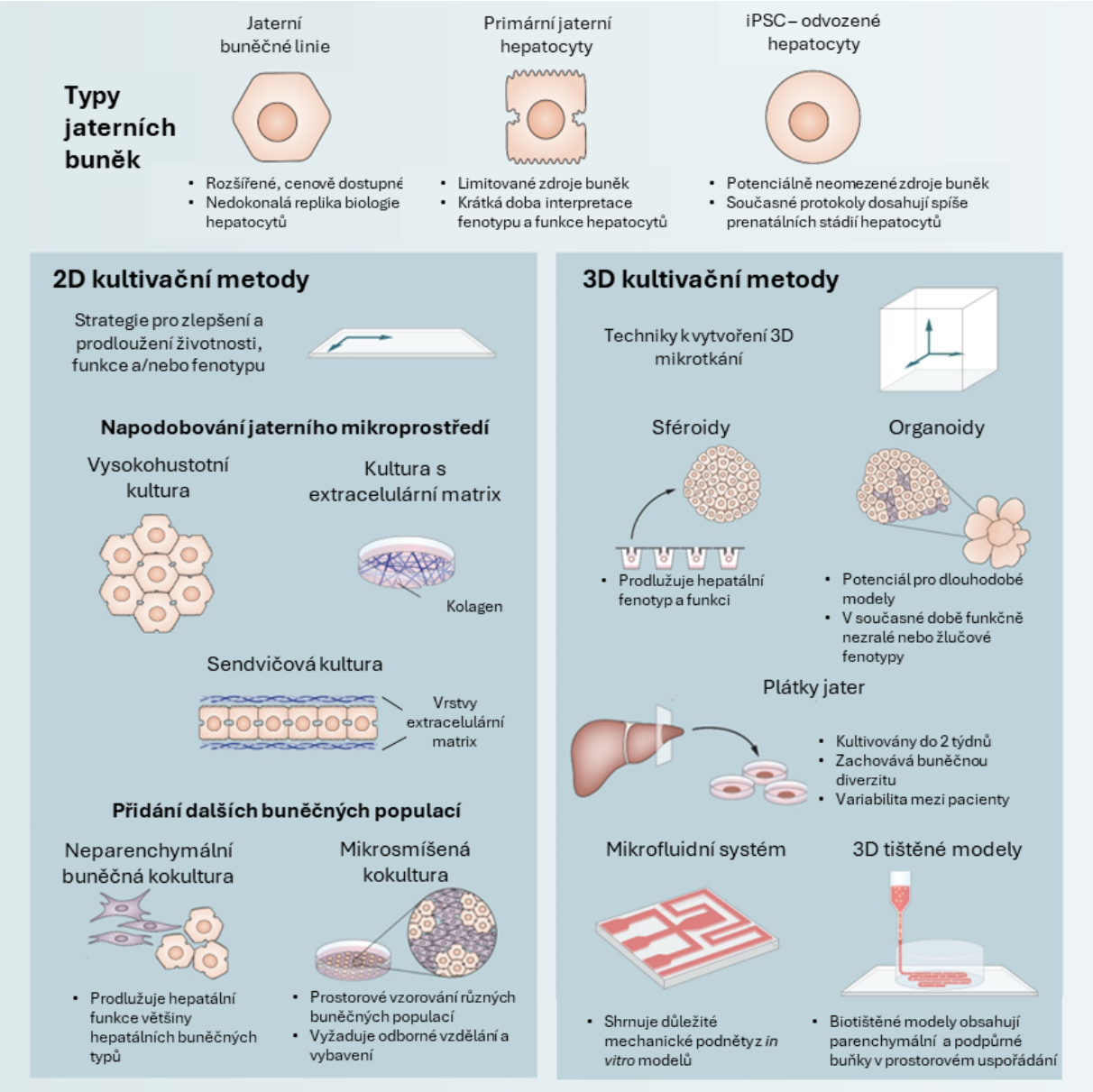
3. Přehled 3D modelů a metod přípravy

3.1 Současné 3D modely

Mezi nejčastější problémy dvourozměrných modelů patří nedostatečná schopnost reprodukovat výsledky z buněčných linií na fyziologii v játrech jako takových. Tuto situaci se snaží vyřešit 3D modely, které vykazují mnohem větší předpoklady, že budou odpovídat situaci *in vivo*. I tak je potřeba vědět, k jakému účelu se budou buňky využívat, a na základě toho si vybrat vhodný model. Přestože některé vypadají velmi podobně, liší se nejen strukturou, ale i stavbou a odpovědí buněk na podobné podněty. Je tedy velmi důležité zvolit nejen vhodný model, ale i složení média. (Kammerer, 2021)

V konvenčních dvourozměrných kultivačních systémech dochází při dlouhodobé kultivaci primárních hepatocytů k jejich dediferenciaci a transdiferenciaci směrem k mezenchymálním liniím vedoucí ke ztrátě buněčné polarity a funkcí. Z toho důvodu byla testována různá vylepšení kultivačních podmínek s cílem vytvořit optimální mikroprostředí pro hepatocyty. Studie se zaměřily na návrh kultivačního systému, který by co nejlépe simuloval přirozené prostředí buněk, a to prostřednictvím vhodné kombinace růstových faktorů, složek extracelulární matrix a přítomnosti sousedních buněk umožňujících buněčné interakce. Mezi inovativní přístupy vedoucí ke zlepšení životaschopnosti a funkčnosti hepatocytů v *ex vivo* podmínkách patří vývoj biomateriálů obsahujících složky jaterního ECM, využití decelularizovaného jaterního ECM, kultivace hepatocytů ve formě sféroidů a organoidů či aplikace perfuzních kultivačních systémů. Trojrozměrné agregáty hepatocytárních sféroidů a organoidů jsou tvořeny samoorganizovanými shluky buněk, které nepřilnou k podkladovému substrátu. Tyto struktury lze generovat různými metodami, např. využitím kultivačních desek s nízkou adhezivitou, závěsných kapkových kultur, mikrojamek, Matrigelu, rotačních bioreaktorů či polymerních „scaffoldů“. (Kaur et al., 2023)

Přehled 2D a 3D buněčných modelů viz Obrázek 8. je vhodným prostředkem pro získání obecného přehledu. 3D modely udržují nebo zlepšují primární jaterní funkce a díky tomu lze sledovat toxicitu po dobu několika týdnů. (Kammerer, 2021)



Obrázek 8. Přehled 2D a 3D kultivačních modelů (převzato a upraveno dle Saxton et al., 2023)

3.1.1 Statické 3D modely

Mezi statické modely se řadí i sféroidy a organoidy, ale tyto modely budou popsány v následujících samostatných kapitolách, protože budou rozebrány podrobněji.

3.1.1.1 Hydrogely

3D modely pěstované v hydrogelu jsou pokročilé *in vitro* systémy, které umožňují růst buněk v prostředí lépe napodobujícím fyziologické podmínky tkání *in vivo*. Hydrogely, např. matrigel nebo alginát, poskytují buněčnou oporu a prostorovou strukturu podporující buněčnou proliferaci, diferenciaci a signalizaci. V modelech dochází k formování buněčných agregátů a mikrostruktur, které lépe reflektují architekturu a funkce živé tkáně, včetně tvorby gradientů

živin, kyslíku a metabolitů. V 3D modelech pěstovaných v hydrogelech lze využít různé buněčné typy, které napomáhají věrně napodobit jaterní mikroprostředí. Nejčastěji se používají primární lidské hepatocyty pro jejich vysokou funkční podobnost s *in vivo* játry, hepatomové linie jako HepG2 pro jejich snadnou kultivaci, a také hepatocytům podobné buňky odvozené z pluripotentních nebo embryonálních kmenových buněk. K dosažení větší komplexity lze modely rozšířit o neparenchymální jaterní buňky. Tyto kombinace umožňují tvorbu vícebuněčných 3D systémů, které jsou vhodné pro výzkum a poskytují relevantnější prostředí pro studium toxikologických účinků, metabolických procesů a testování účinnosti léčiv, čímž významně přispívají ke zlepšení prediktivní hodnoty preklinických studií. (Bachmann et al., 2015)

3.1.1.2 Plátky jater

Přesně řezané plátky jater (PCLS, Precision-Cut Liver Slices) představují jednu z prvních alternativ k testování na zvířatech při studiu onemocnění jater, jelikož zachovávají původní mnohobuněčnou architekturu a mikroprostředí lidské jaterní tkáně. Používají se k modelování různých jaterních patologií, včetně alkoholového poškození nebo metabolických onemocnění, a to buď indukcí toxiny, nebo přímo z nemocných jater. I když jsou přesně řezané plátky jater relativně snadno použitelné, jejich životaschopnost ve standardní kultivaci je omezená na 3–5 dní. Nové přístupy (bioreaktory) slibují prodloužení funkčnosti až na 15 dní. Jejich výhodou je možnost sledovat více parametrů v reálném čase (např. ATP, morfologie, RNA, proteomika), ale omezení zahrnují rychlou degradaci, spontánní aktivaci fibrotických procesů, omezený přístup k lidské tkáni a vysokou variabilitu mezi vzorky. Do budoucna představují přesně řezané plátky jater cenný model pro personalizovanou medicínu a preklinické testování, pokud se podaří standardizovat podmínky a prodloužit jejich stabilitu. (Brenner, 2025)

3.1.2 Dynamické 3D modely

3.1.2.1 Játra na čipu

Mikrofyziologické systémy, známé také jako „játra na čipu“ (organ-on-a-chip), jsou pokročilé 3D jaterní modely s kontinuálním tokem kultivačního média, které napodobují dynamické podmínky *in vivo*. Tyto systémy využívají primární hepatocyty, hepatocyty diferencované z pluripotentních kmenových buněk nebo buněčné linie a díky 3D architektuře, vaskulární perfuzi a proudění média, si buňky udržují funkční a diferencovaný stav po dobu jednoho měsíce i déle. „Játra na čipu“ vykazují fyziologické hladiny produkce albuminu, močoviny a stabilní expresi enzymů cytochromu P450 i transportérů. Na rozdíl od statických kultur

umožňuje proudění média rovnoměrnou distribuci testovaných látek a věrnější simulaci jaterní expozice. Typickým příkladem je jaterní čip složený z hepatocytů, jaterních sinusoidálních endoteliálních buněk a hvězdicovitých buněk v oddělených kanálech, které odpovídají přirozené jaterní mikrostruktuře. Významné využití mají v preklinickém testování léků, především při predikci lidské jaterní toxicity. (Brenner, 2025) Tento 3D model je využíván bioinženýry kvůli svým vlastnostem s neustálou výměnou kultivačního média a odstraňování odumřelých buněk, tudíž zlepšuje celkovou schopnost diferenciace organoidů. (Kammerer, 2021) Výhodou „jater na čipu" je realistické napodobení fyziologického proudění krve a interakcí mezi buněčnými typy, což zajišťuje lepší predikci lidské jaterní odpovědi na léčiva, toxické látky či metabolické změny. Orgány na čipu představují velmi slibnou technologii pro studium farmakokinetiky, hepatotoxicity a vývoj personalizované medicíny. (Serras et al., 2021)

3.1.2.2 Bioprinting jater

Biotisk (3D bioprinting) je pokročilá technologie, která umožňuje přesné prostorové uspořádání buněk a biomateriálů do trojrozměrných struktur napodobujících architekturu a funkci jaterní tkáně. Využívá kombinaci primárních lidských hepatocytů, hepatocytů diferencovaných z indukovaných pluripotentních kmenových buněk a různých neparenchymálních buněk. Tyto buňky jsou vkládány do bioinkoustů na bázi hydrogelů, čímž vznikají strukturálně a funkčně věrné modely lidských jater. Biotištěné jaterní modely se uplatňují v testování léčiv, hodnocení hepatotoxicity a studiu chronických onemocnění jater. Díky realistickému mikroprostředí, dlouhodobé životaschopnosti a možnosti detailních analýz (např. histologie či omics) představují důležitou alternativu k tradičním 2D kulturám i zvířecím modelům. Do budoucna mají potenciál pro využití v personalizované medicíně a vývoji antifibrotických terapií, i když jejich plná standardizace a validace stále probíhá. (Brenner, 2025; Serras et al., 2021)

3.2 Izolace a charakteristika primárních lidských hepatocytů

Nejčastějším a nejdostupnějším zdrojem lidských jaterních buněk je tkáň pocházející z částečné resekce jater prováděné z terapeutických důvodů, např. při odstraňování nádoru. (Horner et al., 2019) Získání materiálu může usnadnit spolupráce s biobankami nebo zdravotnickým zařízením, které může poskytovat jaterní tkáň z chirurgických zákroků za předpokladu, že k jejímu využití dal pacient informovaný souhlas. Alternativně je možné navázat spolupráci s patologickým oddělením v případech, kdy pacient odkázal své tělo

k vědeckým účelům. Nejčastěji se využívají játra od dárců orgánů (buď z transplantace nebo biobanky), částečně nebo celkově resekovaná játra. Izolace ze steatotické jaterní tkáně má velmi proměnlivé výtěžky, takže bylo navrženo, aby se izolace z nemocné jaterní tkáně neprováděla, jelikož to není ekonomicky výhodné. Naopak izolace cirhotických jater je běžná, protože je nejdostupnějším zdrojem. (Bhogal et al., 2011) Dárci zdrojového materiálu by měli být testováni na HIV, hepatitidu A, B i C, lidský T-lymfotropní virus a syfilis a výsledky musí být řádně zaznamenány, aby nezkreslily výzkum. (Peng et al., 2022) Nově se některé studie zabývají tím, jak využít i malé kousky jater po resekci (včetně steatotické tkáně), aby se získalo co nejvíce využitelných buněk pro výzkum. Jedná se o části resekovaných jater, které nejsou dostatečně velké pro perfuzi. Díky upraveným protokolům izolace hepatocytů však mají 65% výtěžnost a zachovávají si typické funkce. (Green et al., 2017) Z etického hlediska je problematické odebírat fetální tkáň, ale je to možné, pokud pacientka dobrovolně podstupující ukončení těhotenství podepíše informovaný souhlas. Díky tomu lze porovnat i funkce jater plodu s jinými zdroji nebo hepatomovými liniemi. (Wesley et al., 2022)

3.2.1 Mechanické metody izolace

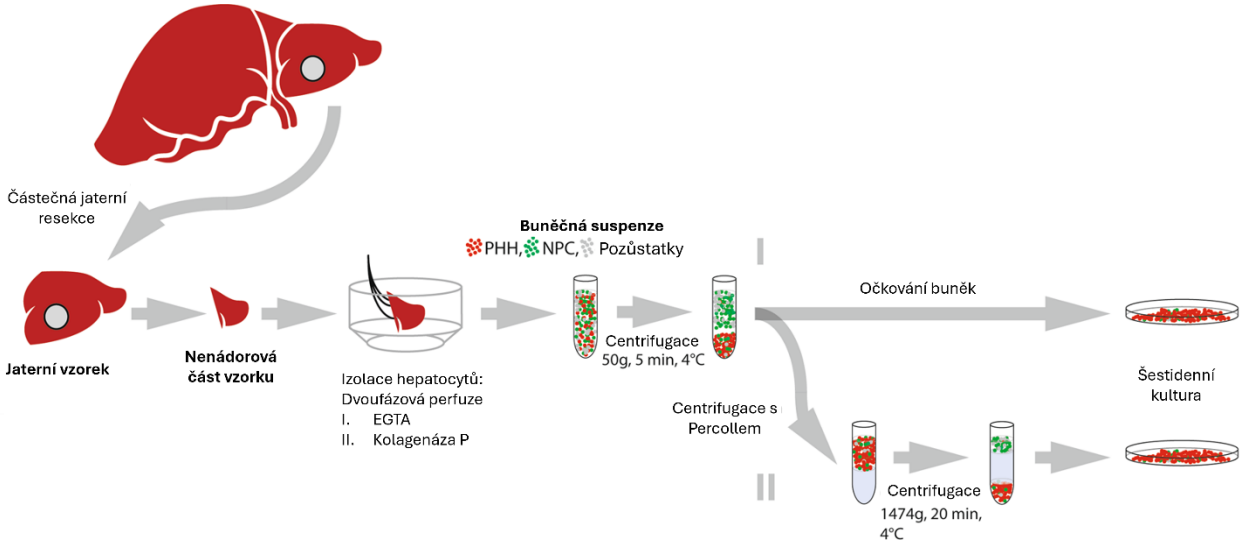
Původním postupem pro izolaci primárních hepatocytů byly mechanické metody např. protřepávání se skleněnými kuličkami, filtrace jater přes tenkou látku, homogenizaci nebo ultrazvuková disociace. Tyto postupy způsobovaly rozsáhlé poškození buněčných membrán a izolované hepatocyty ztrácely své funkce. Výtěžnost byla jen 5–10 % u mechanických metod, takže se zavedla metoda enzymatické perfuze jater, která výrazně zlepšila integritu hepatocytů a výtěžnost. Enzymy působí na okolní buňky skrze jaterní cévy a nepoškozují buněčné membrány. Mechanické metody lze použít, pokud je nutné zachovat buněčné povrchové struktury nebo když enzymatické metody nejsou dostupné. (Kaur et al., 2023)

3.2.2 Enzymatické metody izolace

První zmínky o enzymatické metodě jsou z roku 1969, když Berrym a Friendem byla vyvinuta kolagenázová perfuze jater. (Bhogal et al., 2011) Jejich postup se nadále modifikoval, dokud Seglen nepřišel s průlomovým dvoustupňovým kolagenázovým postupem v roce 1976, který fungoval na krysí hepatocyty a poté se upravil i pro lidské viz Obrázek 9. (Kaur et al., 2023)

Nejprve se jaterní klín promyje fyziologickým roztokem s chelatačním činidlem, aby se odstranily krevní elementy a dosáhlo se dilatace cév. Poté se natráví extracelulární matrix roztokem s vápenatými ionty a kolagenázou, díky které se rozruší mezibuněčné spoje a uvolní

hepatocyty z jaterní tkáně. Játra se mechanicky naruší a buněčná suspenze se přefiltruje pro odstranění přebytečné tkáně. Na závěr se hepatocyty zcentrifugují. Poté se promyjí Dulbeccovým modifikovaným Eagle médiem (DMEM), aby se odstranily zbytky enzymů a nečistot. Je také potřeba zjistit viabilitu buněk, které se docílí barvením trypanovou modří a je potřebná alespoň 50% životaschopnost. (Bhogal et al., 2011)

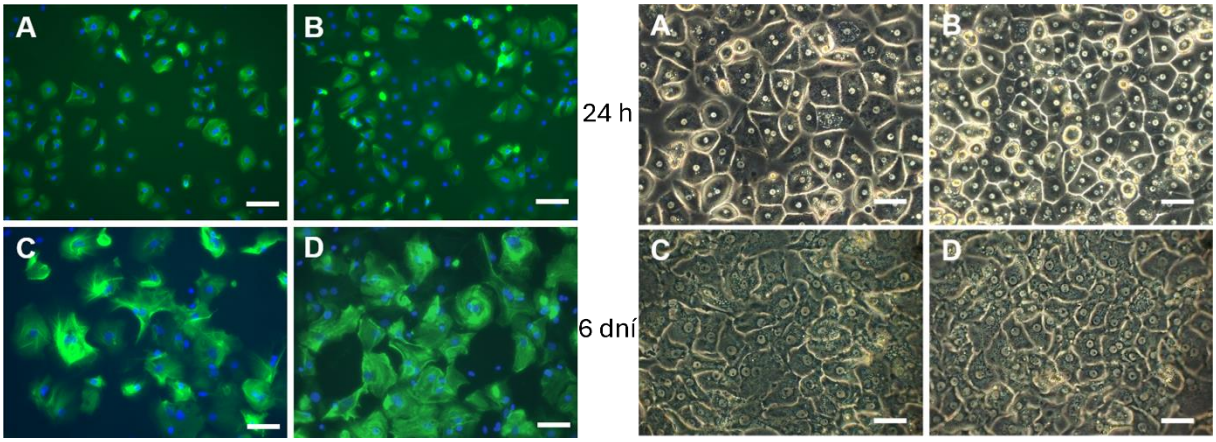


Obrázek 9. Izolace jaterních buněk (převzato a upraveno dle Horner et al., 2019)
PHH – primární lidské hepatocyty, NPC – neparenchymální buňky, EGTA – chelátor vápníku na bázi ethylenglykolu

Dvoustupňová kolagenázová metoda je poměrně výtěžná, ale výsledkem je směsná suspenze, ve které se nachází i další buňky. Aby se dosáhlo větší čistoty, lze využít metodu s Percollem, to je koloidní suspenzní látka, která se využívá jako hustotní gradientní médium pro separaci buněk. Základním principem je, že buněčné populace se snadno oddělují na základě jejich různého vztlaku a hustoty. Živé hepatocyty mají vyšší hustotu, takže se shromažďují na dně zkumavky, zatímco mrtvé buňky a buněčné nečistoty s nižší hustotou zůstávají výše nebo v supernatantu. To vede k čistší frakci životaschopných hepatocytů, což je vyžadováno pro experimenty potřebující vysokou buněčnou viabilitu. (Liu et al., 2023)

Jiná studie tvrdí, že využití Percollu není vždy nutné a záleží na životaschopnosti buněk před tímto krokem. Purifikace Percollem nám může poskytnout homogennější suspenzi, ale nezvyšuje funkci buněk. Ideální by bylo přizpůsobit koncentraci Percollu množství tuku v dárcovských játrech, ale pro to zatím není vhodné histopatologické vyšetření. Tento krok lze vynechat, jestliže je počáteční životaschopnost vysoká, ale pokud je nízká, lze ji zlepšit centrifugací s Percollem. Imunofluorescenční barvení neprokazuje žádné rozdíly mezi buňkami purifikovanými pomocí Percollu a nepurifikovanými viz Obrázek 10. Hepatocyty barvené keratinem 18 vypadají 24 hodin po výsevu kompaktně, oproti tomu po šesti dnech mají vypoulený tvar a nejsou tak husté jako na začátku kultivace. Tento jev se projevuje

u obou vzorků. Fázová kontrastní mikroskopie kultivovaných buněk 24 hodin po výsevu a na konci kultivace neukázala žádné rozdíly mezi oběma skupinami. (Horner et al., 2019)

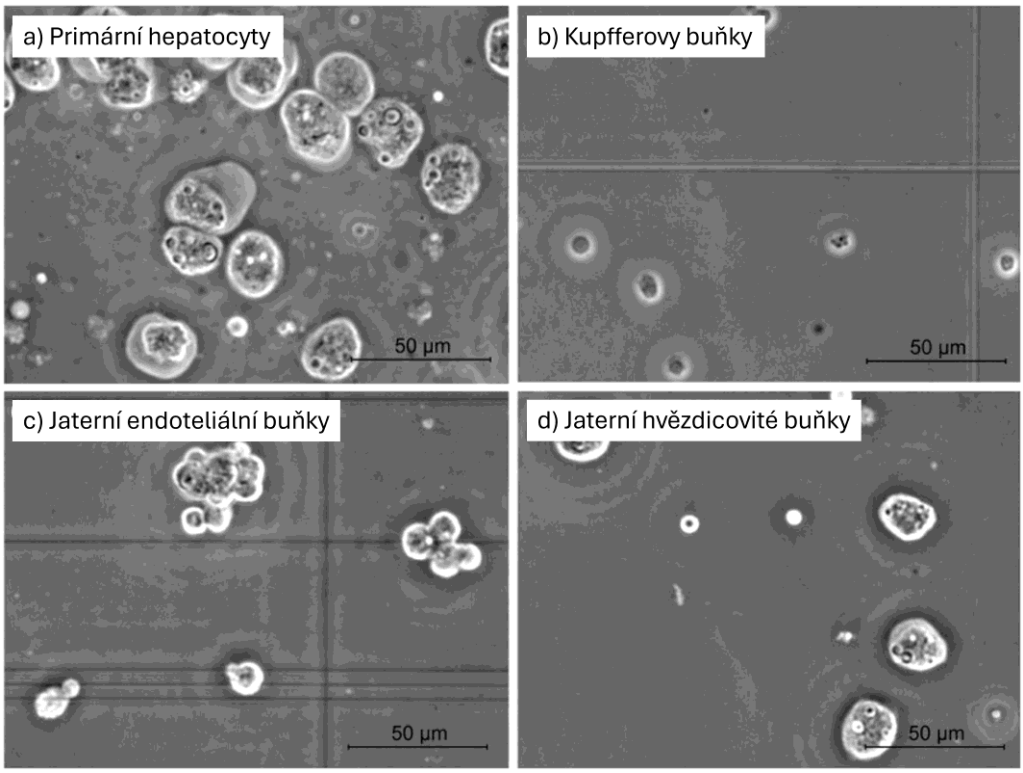


Obrázek 10. Imunofluorescenční barvení a fázový kontrast jaterních buněk bez Percollu (A, C) a s Percollem (B, D) (převzato a upraveno dle Horner et al., 2019)

3.3 Charakterizace izolovaných lidských buněk

3.3.1 Metody pro charakterizaci

Po izolaci buněk je nutné zjistit, zda buněčná suspenze obsahuje pouze buňky např. hepatocyty, které jsme se snažili vyizolovat a které budou potřeba pro následující experiment nebo 3D model. Mezi první kroky identifikace izolovaných buněk patří kontrola pod mikroskopem ve fázovém kontrastu viz Obrázek 11. Jedná se o nejrychlejší a nejlevnější metodu. (Pfeiffer et al., 2015)

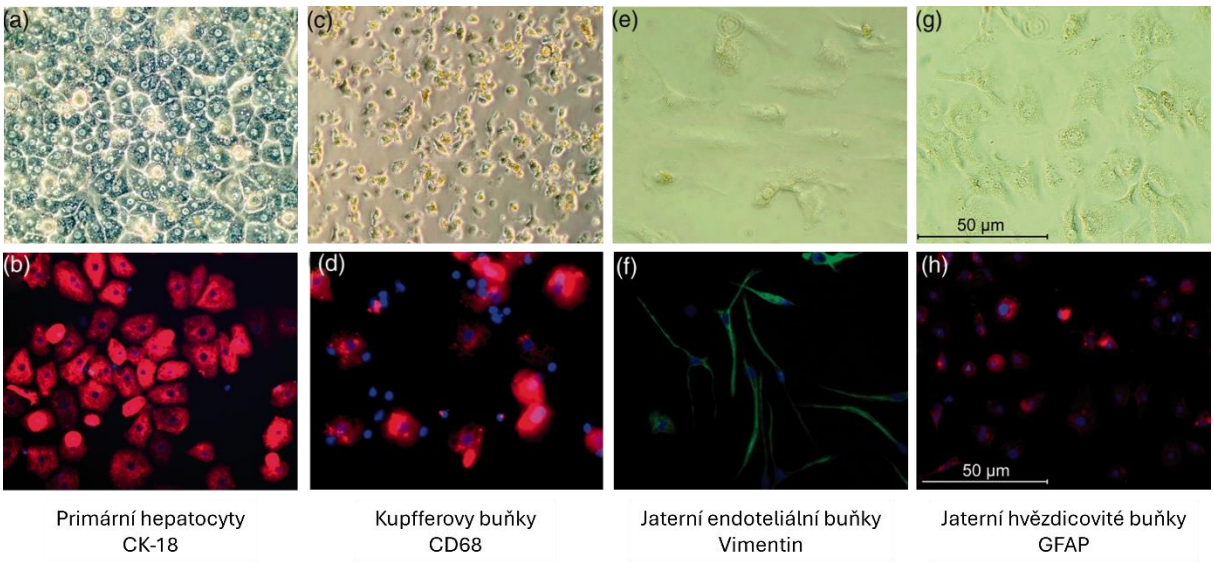


Obrázek 11. Vzhled buněk po izolaci a separaci pod fázovým kontrastem, zvětšeno 400x (převzato a upraveno dle Pfeiffer et al., 2015)

Následným testem může být biochemická analýza, při níž se mezi biochemicky stanovované parametry řadí triacylglyceroly, albumin a močovina. Další ovlivněné parametry dediferenciací PHH jsou dráhy metabolismu lipidů a mastných kyselin. (Kiamehr et al., 2019)

Enzymová analýza (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA) je běžně používaná pro detekci a kvantifikaci specifických proteinů včetně enzymů cytochromu P450, alaninaminotransferáza a aspartátaminotransferáza. ELISA tak poskytuje citlivou a specifickou detekci enzymů, která je klíčová při hodnocení jaterních funkcí i metabolické aktivitě hepatocytů. Hladina ATP ve sféroidech může být stanovena enzymovou analýzou založenou na luminiscenční reakci díky enzymu luciferáza. Jelikož ATP pochází výhradně z živých buněk, intenzita luminiscence přímo koreluje s jejich počtem. (Morciano et al., 2020)

Mezi široce využívané metody pro hodnocení funkčního stavu hepatocytů *in vitro* patří imunofluorescenční barvení, což je metoda sloužící k detekci a vizualizaci specifických proteinů, např. albuminu, alfa-fetoproteinu, cytokeratinu 18 (CK18). Princip této techniky spočívá v použití fluorescenčně značených protilátek, které se specificky vážou na cílový protein. To umožňuje jeho lokalizaci a analýzu pomocí fluorescenční mikroskopie. Detekce fluorescence se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu, přičemž intenzita a distribuce signálu odráží expresi a lokalizaci proteinu v jaterních buňkách viz Obrázek 12. (Pfeiffer et al., 2015)



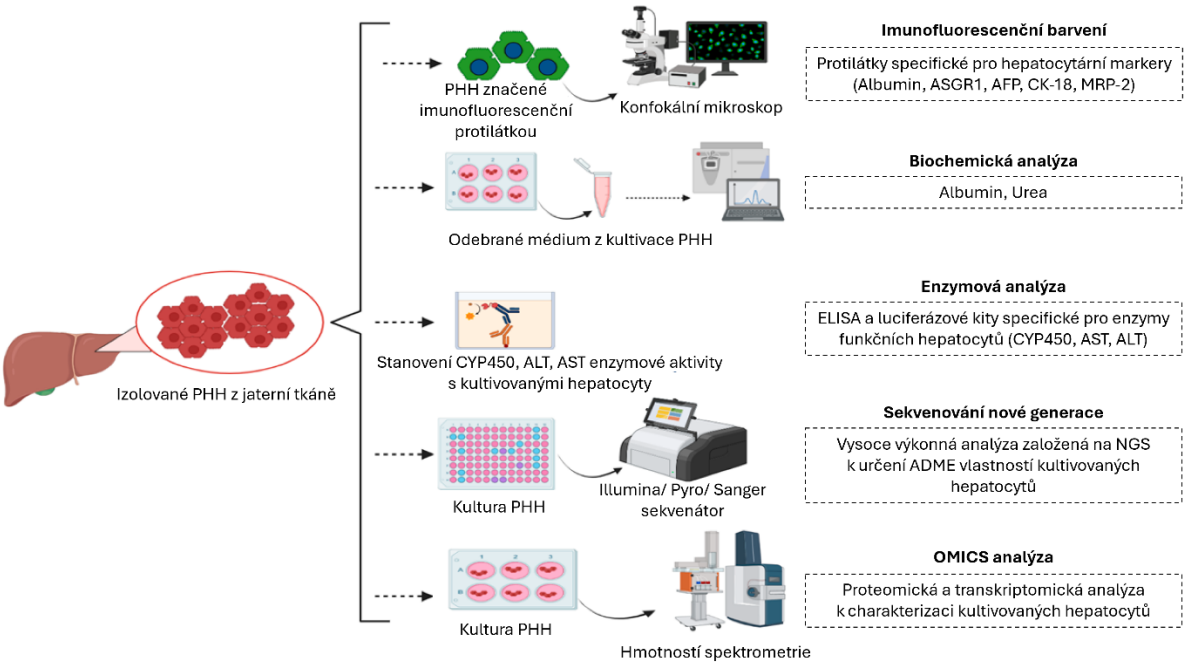
Obrázek 12. Morfologický vzhled adherentních jaterních buněk ve fázovém kontrastu (a, c, e, g) a imunofluorescenční barvení buněčných typově specifických antigenů (b, d, f, h), (převzato a upraveno dle Pfeiffer et al., 2015) (CK-18 – cytokeratin 18, GFAP – gliální fibrilární acidický protein)

Primární hepatocyty se vyznačují krychlovitým tvarem s polyploidními jádry (Obrázek 12a, c) a jsou pozitivní na hepatocytární marker cytokeratin 18. (Pfeiffer et al., 2015) CK18 je intermediární filamentární protein, který se v játrech vyskytuje ve vysokém množství a tvoří přibližně 5 % celkového proteinového obsahu jater. Během apoptózy dochází k jeho štěpení, přičemž vzniklé fragmenty lze detekovat pomocí M30 protilátky, která specificky rozpoznává uvolněný C-konec CK18. (Altaf et al., 2020)

Kupfferovy buňky mají malý kulovitý tvar s výrazným kulatým buněčným jádrem (Obrázek 12b, d) a vykazují imunoreaktivitu vůči povrchovému proteinu CD68 (někdy také LAMP-4), který je specifický pro makrofágy. CD68 je transmembránový glykoprotein primárně lokalizovaný v endozomálním a lysozomálním kompartmentu, kde je ukotven prostřednictvím membránové domény asociované s lysozomy. Jaterní endoteliální buňky jsou vřetenovitého tvaru s oválným jádrem (Obrázek 12e, f) a exprimují mezenchymální buněčný marker vimentin, který je intermediárním filamentárním proteinem typickým hlavně pro aktivované jaterní hvězdicovité buňky a epiteliálně-mezenchymální tranzici. Jaterní hvězdicovité buňky byly charakterizovány kulovitým tvarem s výraznými lipidovými kapénkami (Obrázek 12g, h) a jejich přítomnost byla potvrzena imunofluorescenčním barvením zaměřeným na gliální fibrilární acidický protein (GFAP). (Pfeiffer et al., 2015)

NGS (Next-Generation Sequencing) je moderní metoda sekvenování DNA umožňující rychlé a rozsáhlé genetické analýzy. ADME označuje procesy Absorpce, Distribuce, Metabolismu a Exkrece léčiv v organismu, které zároveň vysvětlují výše uvedenou zkratku. Společně se využívají ke studiu genetických variant ovlivňujících metabolismus léků a individuální reakce na léčbu, čímž přispívají k rozvoji personalizované medicíny. (Klein et al., 2019)

OMICS přístupy představují moderní nástroje pro komplexní molekulární charakterizaci jaterních buněk, zejména primárních lidských hepatocytů, a zahrnují analýzu genomu, transkriptomu, proteomu a metabolomu. Integrace těchto dat umožňuje hlubší porozumění jaterní fyziologii, patogenezi nemocí a reakci na léčiva. Také přispívá k identifikaci biomarkerů, predikci toxicity a personalizaci léčby. OMICS je klíčovou rolí pro vývoj pokročilých *in vitro* modelů a předklinické testování léčiv. (Rentschler et al., 2024) Pro přehlednost viz Obrázek 13. jsou uvedeny všechny výše zmíněné metody:



Obrázek 13. Techniky pro charakterizaci hepatocytů (převzato a upraveno dle Kaur et al., 2023) (ASGR1 – Asailoglykoproteinový receptor 1, AFP – alfa fetoprotein, CK18 – cytokeratin 18, MRP-2 – multi drug resistance protein-2, ELISA – enzymový imunosorbentní test, AST – aspartátaminotransferáza, ALT – alaninaminotransferáza, ADME – absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování)

3.3.2 Charakterizace primárních lidských hepatocytů

Primární hepatocyty jsou buňky, které jsou odebrané přímo z tkáně organismu, tedy jater, a kultivací vzniká primární kultura. Následným pasážováním se z primární kultury stává sekundární, a tímto způsobem lze udržet živou kulturu po týdny až měsíce. PHH si zachovávají diferencované vlastnosti (morfologické, molekulární i funkční) odpovídající jejich původu. Pokud hepatocytům dopřejeme specifické podmínky, je možné je stimulovat k sestavení trojrozměrných struktur, které jsou miniaturní formou jater a díky tomu lze analyzovat funkce této tkáně. (Alberts et al., 2022, str. 477)

Primární lidské hepatocyty nejsou vhodné pro dlouhodobé výzkumy, protože po izolaci a kultivaci velmi rychle dediferencují *in vitro*. Vhodné jsou pro krátkodobé toxikologické analýzy. (Kammerer, 2021) Pokud bychom je kultivovali ve 2D podmínkách, musejí si zachovat morfologii jako *in vivo*, to znamená, že jejich tvar zůstane polyedrický a mají průměr 20–30 µm s kulatými jádry pozorovatelnými optickým mikroskopem a životaschopnost alespoň 70 %. Mezi základní parametry pro validaci PHH patří exprese albuminu a HNF4A u více než 90 % populace a u adherentních metod i sekrece žluči. (Peng et al., 2022) Mezi klíčové vlastnosti hepatocytů spadá: exprese albuminu, produkce močoviny, ukládání glykogenu, exprese enzymů zapojená do metabolismu léčiv – CYP a jeho 5 izoforem. Jejich aktivitu lze stanovit ultraúčinnou kapalinovou chromatografií s detekcí kvadrupólovým

hmotnostním spektrometrem. Všechny tyto vlastnosti jsou důležité pro posouzení funkčnosti modelů. (Kanebratt et al., 2021)

PHH kultivované ve 3D modelech společně s neparenchymálními buňkami včetně jaterních sinusoidálních endotelových buněk a Kupfferových buněk, vykazují zvýšenou funkčnost projevující se vyšší sekrecí močoviny a albuminu a zvýšenou aktivitou enzymů CYP. Kromě toho trojkomponentní kultura umožňuje vyvolání toxických odpovědí, které lépe odpovídají procesům probíhajícím *in vivo*, čímž vytváří vhodnou platformu pro pokročilá hodnocení hepatotoxicity. (Gandhi et al., 2024)

Všechny PHH musí být negativně testovány na bakterie, plísně, mykoplazmata, HIV, hepatitidu B, C a další choroby, aby mohly být výsledky interpretovány. Mohou být i kryokonzerovány podle zásad kryokonzervace savčích buněk. (Peng et al., 2022) Doposud se ukazuje, že sféroidní kultury PHH hrají v toxikologických analýzách významnější roli než perfundované bioreaktory. Ve studiích hepatotoxicity jsou PHH často využívány a považovány za optimální kompromis – nabízejí přesné a stabilní predikce léčivem indukovaného jaterního poškození a zachovávají si primární charakteristiky po dobu několika týdnů. (Kammerer, 2021)

3.3.3 Hepatocyty připravené technologií Upcyte

Technologie Upcyte (Upcyte Hepatocytes/Primary-Like Hepatocytes nebo také primární hepatocyty II. generace) je metoda založená na lentivirovém přenosu genů indukujících proliferaci do primárních lidských hepatocytů, čímž se prodlužuje jejich životnost až na 30 zdvojení buněk při zachování klíčových jaterních funkcí. Tyto buňky si uchovávají polaritu, metabolické enzymy a vykazují schopnosti jako syntéza albuminu, sekrece močoviny a ukládání glykogenu, přičemž genový profil je bližší PHH než např. HepG2 liniím. Využívají se především pro studie lékových interakcí, metabolismu léčiv a opakovatelná testování ve velkém měřítku díky jejich proliferaci a dostupnosti od stejného dárce. Jejich potenciál spočívá v kombinaci výhod primárních buněk a buněčných linií – jsou snadno použitelné, kontaktně inhibované a lze je využít i v personalizovaném výzkumu. Vedle přístupu Upcyte existují i další strategie pro prodloužení kultivační životnosti PHH, jejich konverze na jaterní progenitorové buňky či kultivace v hypoxii, které rovněž otevírají cestu ke generování funkčních jaterních modelů od různých dárců. (Kammerer, 2021)

3.4 Média využívaná pro kultivaci hepatocytů

Nejčastěji se pro kultivaci hepatocytů využívají Dulbeccovo modifikované Eagle médium (DMEM), Williamsovo médium E nebo modifikované Cheeovo médium, která bývají doplněna dalšími složkami. Inzulín, endoteliální růstový faktor, glukagon a glukokortikoidy např. dexamethason, hydrokortizon pomáhají udržovat hepatocyty v diferencovaném stavu. Inzulín zlepšuje morfologii buněk, glukokortikoidy a glukagon indukují jaterní genovou expresi. Endoteliální růstový faktor má schopnost indukovat syntézu DNA v primárních hepatocytech a velmi významný je i hepatocytární růstový faktor, který je klíčový při zvyšování tvorby močoviny. Pro primární kulturu embryonálních kmenových buněk nebo iPSC je důležitým faktorem onkostatin M, jež iniciuje jaterní zrání a diferenciaci. Fetální hovězí sérum (PBS) se u hepatocytů používá jen pro podporu uchycení, ale jinak není doporučováno, protože narušuje tvorbu žlučových kanálků a podporuje dediferenciaci hepatocytů. (Kaur et al., 2023)

Přírodní a syntetické biomateriály hrají klíčovou roli v inženýrství jaterní tkáně díky své schopnosti vytvářet podpůrné prostředí pro buněčný růst a funkci. Přírodní biomateriály (kolagen, želatina či alginát, jsou makromolekuly pocházející ze zvířat, rostlin nebo lidských tkání) se vyznačují výbornou biokompatibilitou, biologickou rozložitelností a schopností remodelace. Podporují buněčnou migraci, proliferaci, diferenciaci i adhezi a jsou hojně využívány k opravě či náhradě poškozených orgánů. Syntetické biomateriály přinášejí možnost precizního řízení fyzikálních a chemických vlastností materiálu, včetně porozity, tvarové stálosti a degradace. Slouží jako nosiče pro jaterní buňky, podporují jejich přežití, uspořádání a funkční zrání, a umožňují tvorbu 3D struktur napodobujících přirozenou extracelulární matrix. Díky těmto vlastnostem jsou využívány v modelování jaterních funkcí, testování hepatotoxicity, vývoji léčiv i regenerativní medicíně, přičemž vhodná kombinace přírodních a syntetických materiálů nabízí cestu k vytváření ještě sofistikovanějších a funkčnějších jaterních modelů. (Yang et al., 2022)

4. Sféroidy

Sféroidy jsou vícebuněčné 3D modely známé již desítky let, které se vytvářejí bez potřeby podpůrného lešení a mohou být složeny z různých typů tkání. V případě jaterních sféroidů jde o trojrozměrné shluky zhruba 3000–5000 buněk, zahrnující primární hepatocyty i další neparenchymální buňky ze zdravých či nemocných jater. Vznikají spontánním seskupením buněk, nejčastěji z kryokonzervovaných vzorků, v destičkách s ultra nízkou adhezivitou nebo pomocí metody zavěšených kapek, která je umožňuje standardizovat. Tyto modely lze dále ovlivňovat chemickými koktejly k navození steatózy, zánětu či fibrózy. Mezi jejich limity patří variabilita mezi dárci a riziko imunitních nesouladů při kombinaci buněk od různých jedinců, což lze minimalizovat použitím buněk od jednoho dárce a jejich genotypizací. (Kammerer, 2021; Brenner, 2025)

4.1 Sféroidy z imortalizovaných linií

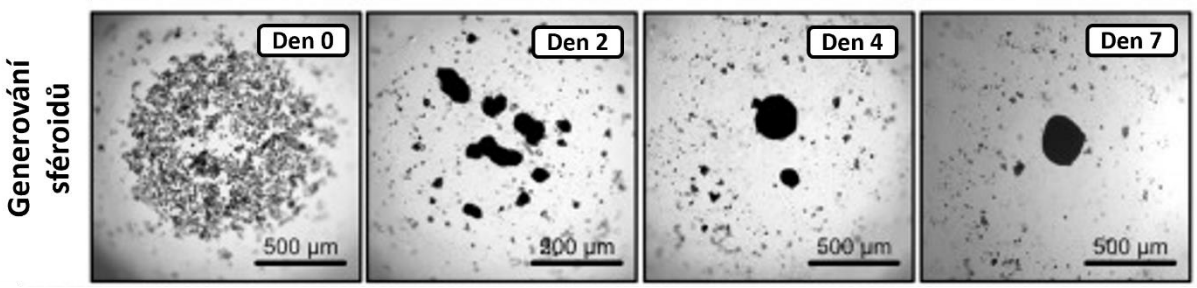
Imortalizované buněčné linie HepG2 a HepaRG jsou dobře dostupné, cenově výhodné a důkladně prozkoumané modely, které umožňují srovnávání nových výsledků s již existujícími studiemi. Standardně se využívají zejména pro testování toxicity léčiv, a to především v 2D kulturách, kde si částečně zachovávají své primární charakteristiky, i když některé funkce je třeba geneticky upravit. Ve 3D sféroidech vykazuje HepG2 vyšší citlivost na hepatotoxiny než v 2D modelech, nicméně její celková predikční schopnost je omezená a výrazně nižší než u primárních lidských hepatocytů. Naproti tomu HepaRG buňky ve 3D sféroidech lépe napodobují jaterní funkce, které si dokážou udržet i po dobu několika týdnů, a jsou tak vhodnější pro dlouhodobé toxikologické testování, přestože i u nich je nutná optimalizace aktivity enzymů cytochromu P450 pro dosažení spolehlivých výsledků. (Kammerer, 2021)

Buněčné linie, např. HepG2 a HepaRG, se hojně využívají ve 3D sféroidních modelech jater pro studium metabolismu léčiv, hepatotoxicity a jaterních onemocnění. Díky své snadné dostupnosti, vysoké proliferaci a schopnosti spontánně tvořit kompaktní shluky v prostředí s nízkou adhezivitou jsou tyto linie vhodné pro vysokokapacitní screening a toxikologické testy včetně dlouhodobých studií. I když jejich enzymatická aktivita není plně srovnatelná s primárními hepatocyty, 3D uspořádání částečně kompenzuje tento deficit – zlepšuje buněčnou polarizaci, životaschopnost a fyziologické chování buněk. V modelu založeném na HepaRG sféroidech byla prokázána udržitelnost jaterně specifických funkcí i citlivost na genotoxické látky, čímž se potvrdila jejich vhodnost pro hodnocení látkami indukovaného jaterního poškození. Podobně byly HepG2 sféroidy využity k modelování interakcí nádorových

a stromálních buněk u hepatocelulárního karcinomu, což rozšiřuje jejich uplatnění i na oblast onkologického výzkumu. (Mandon et al., 2019; Zaki et al., 2021)

4.2 Sféroidy z primárních lidských hepatocytů

Tvorba kompaktních lidských jaterních sféroidů závisí na několika klíčových faktorech, zejména na počtu a kvalitě jaterních buněk. Kritickým aspektem je použití primárních hepatocytů s vysokou životaschopností, přičemž optimalizace jejich množství na jamku často vyžaduje jeho navýšení. Důležitou roli hraje také protřepávání destičky během prvních dvou dnů kultivace, které podporuje buněčnou agregaci a usnadňuje vznik sféroidů. Normální lidské jaterní sféroidy mají kulatý tvar a pevnou strukturální integritu, lze to pozorovat pomocí mikroskopie ve světlém poli viz Obrázek 14. Po dobu až 14 dní zůstávají životaschopné, jak dokazuje absence ATP v supernatantu, a zároveň si udržují svou funkčnost prostřednictvím stabilní sekrece močoviny a albuminu do růstového média. (Kim et al., 2024)

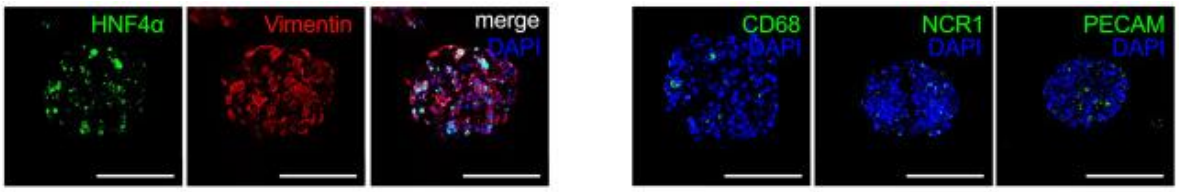


Obrázek 14. Generování kokultivovaných sféroidů (převzato a upraveno dle Kim et al., 2024)

Pro tvorbu 3D lidských sféroidů lze využít jak čerstvě izolované, tak kryokonzervované parenchymální a neparenchymální frakce buněk získané od zdravých dárců i pacientů s nealkoholickou steatohepatitidou nebo alkoholovou jaterní chorobou. Kombinace buněk z normálních a nemocných tkání může pomoci lépe pochopit buněčné interakce a signalizační dráhy ve sféroidech. Tyto modely představují cenný nástroj pro výzkum a mohou být využity při testování nových léčiv. (Liu et al., 2023) Čerstvě izolované hepatocyty jsou obecně vhodné pro tvorbu jaterních sféroidů, zatímco pouze některé kryokonzervované hepatocyty jsou schopny sféroidy úspěšně vytvářet, jelikož kryokonzervace může způsobit jejich poškození. Hepatocyty od zdravých dárců lze obvykle zmrazit a po rozmrazení použít pro generování sféroidů. Naopak kryokonzervované steatotické hepatocyty se pro tento účel nedoporučují, protože jejich křehkost je činí náchylnými k artefaktům zmrazení a rozmrazení, následně vedou ke špatné buněčné kondici a selhání tvorby sféroidů. (Kim et al., 2024)

Lidské jaterní sféroidy jsou tvořeny kokultivací primárními hepatocyty zhruba z 57 %, neparenchymálními buňkami z 28 % a jaterními hvězdicovitými buňkami z 15 %, což lze

pozorovat při imunohistochemickém barvení viz Obrázek 15. V lidských 3D jaterních sféroidech byla pozorována exprese proteinu albuminu a mRNA hepatocytárních markerů CK18, HNF4A, RBP4 a CYP2E1, přičemž exprese CYP3A4 byla původně nízká, ale začala se postupně zvyšovat v závislosti na čase, pravděpodobně díky přítomnosti jaterních hvězdicovitých buněk, které mohly podporovat tvorbu sinusové struktury jater a tím stimulovat aktivitu CYP3A4. (Kim et al., 2024)



Obrázek 15. Imunohistochemické barvení kokultivovaných sféroidů (převzato a upraveno dle Kim et al., 2024)

4.2.1 Inovace sféroidů z primárních lidských hepatocytů

Hepatocyty kultivované s kolagenem jsou organizovány jako charakteristické duté sféroidy (Hepoid) schopné udržovat přežití, buněčnou polaritu a jaterní diferenciaci po dlouhodobé kultivační období nejméně 28 dnů. Inkubace hepatocytů v destičce s ultra nízkou adhezivní silou je zásadním krokem pro navázání mezibuněčných kontaktů a umožnění tvorby agregátů, které budou zahrnuty do kolagenové matrice. Hepoid vykazuje schopnost proliferace, dlouhodobého přežití, jaterní diferenciace, biotransformace xenobiotik a buněčné polarity typické pro normální lidské hepatocyty. Výsledky studie ukazují, že PHH může opět zahájit buněčný cyklus po dočasné inhibici signální dráhy MAPK MER1/2-ERK1/2. Zatímco nižší koncentrace kolagenu I nemá vliv na proliferaci hepatocytů, zvýšením dochází k inhibici proliferace. Tyto podmínky vyvolaly dvě vlny proliferace v hepatocytech, které lze připsat interakcím buňka-buňka a buňka-matrice. (Rose et al., 2021)

Další možností jsou dlouhodobé bioreaktorové kultury, které podporují hydrodynamickými silami agregaci buněk a simulují procesy *in vivo.* V této studii byly provedeny testy s lidskými hepatocyty a mezenchymálními kmenovými buňkami lidské kostní dřeně. Výsledky ukázaly, že kokultura těchto buněk prodlužuje životaschopnost, buněčnou integritu a stabilitu charakteristických vlastností. Tento efekt je výrazně delší než u monokultury sféroidů z hepatocytů. Kokultura je tedy vhodná pro testování toxikologického profilu léčiv. (Rebelo et al., 2015)

4.2.2 Využití sféroidů

Ze studií vyplývá, že sféroidy z primárních lidských hepatocytů jsou životaschopné 2–7 týdnů se stabilními vlastnostmi, které jsou zmíněny výše, z čehož vyplývá, že jsou vhodné

pro testování toxicity, vývoj léčiv a predikci léky indukovaného poškození jater. Kokultura s NPC, též nazývaná mikrotkáňová, také vyjadřuje efektivitu při použití pro vývoj léčiv a studium toxicity. (Kammerer, 2021) PHH v monokultuře jsou běžně využívané při vývoji léčiv, studiu jaterního metabolismu, identifikaci metabolitů, zkoumání enzymové inhibice a studiích enzymové indukce. Pro přesnější predikci výsledků léčby *in vivo* je však nutné jejich kombinování s farmakokineticko-farmakodynamickými modely. (Kanebratt et al., 2021) Buňky ve sféroidech se spontánně shlukují, ale nejsou schopny vytvářet větší tkáňové struktury ani se regenerovat. Narozdíl od sféroidů mají organoidy vyšší úroveň buněčné organizace, často obsahují více typů buněk a mohou napodobovat tkáňovou architekturu a funkční vlastnosti orgánů, která jim umožňuje dlouhodobější růst a sebeobnovu. Z těchto důvodů nejsou sféroidy tak pokročilé jako organoidy, které budou představeny v následující kapitole. (Kim et al., 2024)

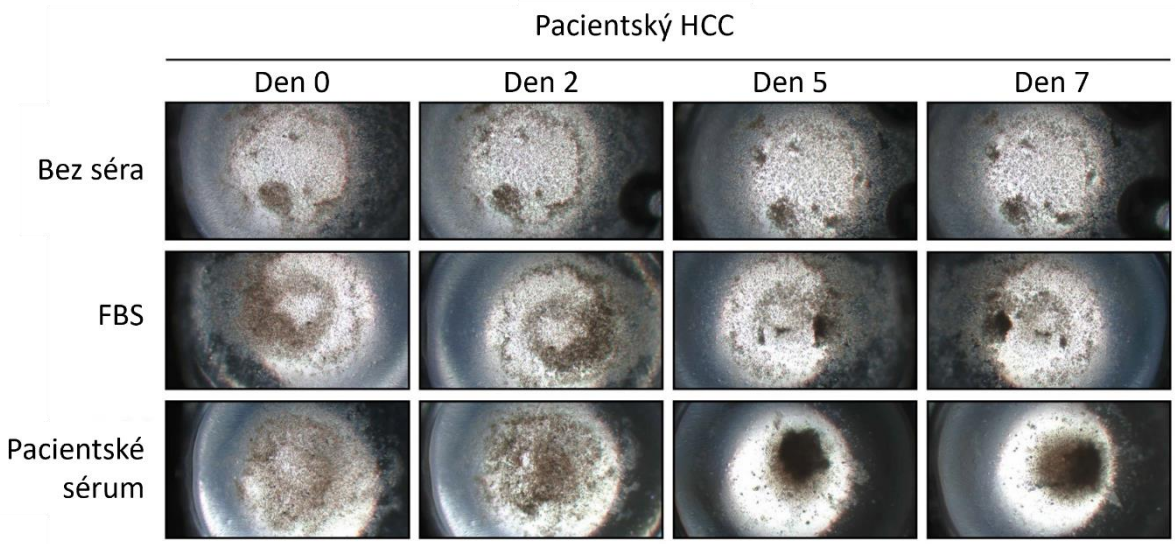
Z nové studie vyplývá, že lze kokultivovat primární myší hepatocyty s nádorovými liniemi za účelem výzkumu účinku chemoterapeutik na zdravé jaterní a rakovinné buňky. Zároveň efektivněji zkoumá procesy spojené se stavem sféroidů díky extracelulárním váčkům z kultivačního média tvořených z membrány, které obsahují proteiny, enzymy, nukleové kyseliny a lipidy. Sféroidy byly kultivovány v destičce s ultra nízkým uchycením za využití linie HepG2, Huh7 a HTB-52 (*dle ATCC, poznámka autora*). Tento model nabízí do budoucna velmi zajímavý základ pro testování sféroidů s lidskými PHH a zjištění citlivosti a specifičnosti protinádorových léčiv. (Royo et al., 2024)

4.3 Pacientské sféroidy

Model vícebuněčných nádorových sféroidů odvozený z pacientských buněk HCC, lidských hvězdicovitých buněk, fibroblastů a HUVEC napodobil nádorové mikroprostředí a umožnil testování citlivosti chemoterapeutik. Tato kokultura byla výrazně citlivější na sorafenib ve srovnání s 2D kulturami, ale variabilita mezi pacientskými vzorky a standardizace prozatím chybí. Přesto je jednou z prvních zmínek o personalizované onkologii, která by umožnila efektivnější výběr protinádorových léčiv na základě individuální odpovědi. (Song et al., 2018)

Sféroidy odvozené z nádorové tkáně pacienta jsou zatím poměrně vzácné, nicméně velmi důležité. Jedná se o velký pokrok ve tvorbě sféroidů, protože přináší nové možnosti testování a porozumění těmto nádorům. Klíčovou roli sehrála autologní séra pacientů s hepatocelulárním karcinomem (HCC) při tvorbě a udržování 3D sféroidů odvozených z nádorových tkání. Přidání pacientského séra do kultivačního média výrazně zlepšilo životaschopnost buněk, podpořilo

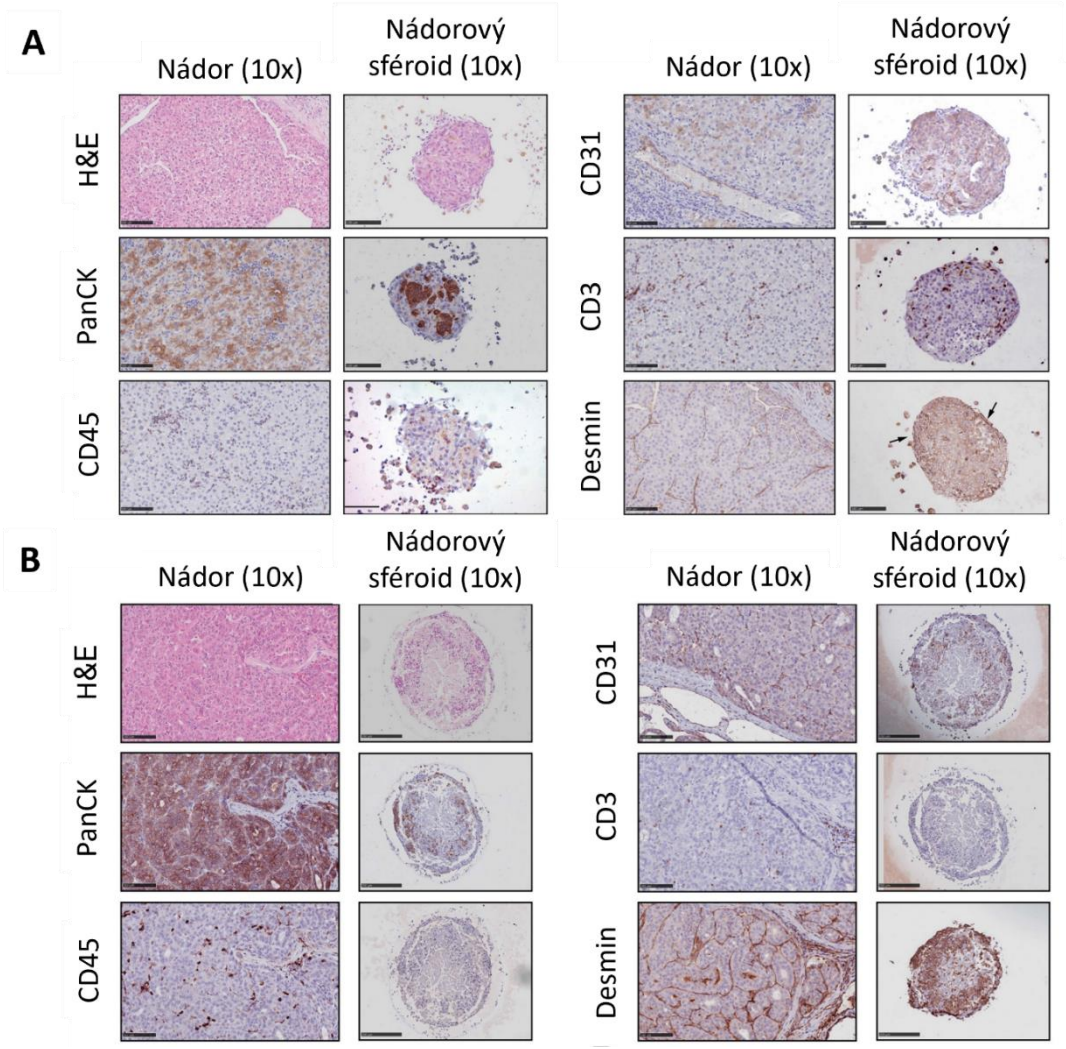
jejich agregaci a kompaktní formování sféroidů, čímž umožnilo zachování složitého nádorového mikroprostředí včetně imunitních buněk, fibroblastů a endotelových buněk viz Obrázek 16. Na rozdíl od běžně používaného fetálního bovinního séra (FBS) poskytovalo HCC sérum specifické růstové faktory, cytokiny a další rozpustné složky, které podporovaly přežití a funkčnost různých buněčných populací bez nadměrné proliferace. Např. v kokulturách Huh7 a LX2 buněk vedlo HCC sérum k aktivaci hvězdicovitých buněk a diferenciaci makrofágů, čímž napodobilo imunosupresivní prostředí typické pro HCC. Celkově použití autologního séra umožnilo vytvoření fyziologicky relevantního modelu pro testování protinádorových léčiv a studium interakcí mezi nádorovými a stromálními buňkami. (Crouchet et al., 2025)



Obrázek 16. Role séra při tvorbě pacientských nádorových sféroidů (převzato a upraveno dle Crouchet et al., 2025) FBS – fetální bovinní sérum

Nádorové sféroidy odpovídají svou stavbou tkáni, ze které byly odvozeny, což bylo ověřeno barvením viz Obrázek 17. a průtokovou cytometrií. Histologické barvení bylo využito ke srovnání struktury původní nádorové tkáně a z ní odvozených 3D sféroidů hepatocelulárního karcinomu. Pro základní morfologické hodnocení bylo použito barvení hematoxylin-eozin, které odhalilo zachování kompaktní struktury a buněčné hustoty ve sféroidech. Imunohistochemické barvení pak umožnilo identifikaci specifických buněčných populací pomocí markerů. Výsledky ukázaly, že sféroidy si zachovávají klíčové komponenty nádorového mikroprostředí. To potvrzuje jejich vhodnost pro preklinické modely a testování léčebných přístupů. Průtoková cytometrie posloužila k detailní charakterizaci buněčného složení sféroidů odvozených od pacientů s HCC a kvantifikaci buněčného zastoupení. Tato průlomová studie představuje inovativní a klinicky relevantní trojrozměrný model, který je vhodný nejen pro hlubší porozumění interakcím mezi buňkami v nádoru, ale i jako

testovací platforma pro protinádorové látky, zejména ty, které cílí na mikroprostředí nádoru. Díky reprodukovatelnosti a přenositelnosti má model potenciál stát se nástrojem pro predikci individuální odpovědi pacientů na léčbu a přispět tak k rozvoji personalizované onkologie. (Crouchet et al., 2025)



Obrázek 17. Zobrazení heterogenity nádorových sféroidů (A, B) barvením (převzato a upraveno dle Crouchet et al., 2025) H&E – barvení hematoxylin-eosin

Jiná studie uvádí, že byly využity sféroidy z buněčné linie HepG2 společně s jaterními hvězdicovitými buňkami, monocyty odvozenými z lidské leukemické buněčné linie a se sérem pacientů s HCC, která vedla k vytvoření věrného nádorového mikroprostředí. Model byl testován na odpověď vůči tyrosinkinázovým inhibitorům – sorafenib, cabozantinib a lenvatinib. Výsledky ukázaly, že sféroidy reagovaly na léčiva způsobem odpovídajícím klinickým odpovědím pacientů. Správně bylo předpovězeno 34 z 37 klinických odpovědí na tyrosinkinázové inhibitory u 32 pacientů s HCC, což potvrzuje potenciál nádorového modelu pro predikci individuální odpovědi na léčbu. (Cherradi et al., 2025)

5. Organoidy

Podle slovníku ScienceDirect je organoid obecně definován jako „soubor buněk specifických pro daný orgán, který se vyvíjí z kmenových buněk nebo orgánových progenitorů a samoorganizuje se prostřednictvím buněčného třídění a prostorově omezeného závazku k určité buněčné linii způsobem podobným *in vivo*.“ (Elsevier, Organoid, 2025) Simian et al. definují organoid následovně: „*in vitro* 3D buněčný klastr odvozený výhradně z primární tkáně, embryonálních kmenových buněk nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk, schopných sebeobnovy a sebeorganizace, vykazující podobnou orgánovou funkčnost jako tkáň původu.“ Organoidy jsou tedy pokročilé prostorově uspořádané buněčné modely orgánově specifických buněk, odvozené z progenitorových, kmenových nebo diferencovaných buněk. Pro jejich kultivaci je někdy používáno extracelulární lešení (matrix), které poskytuje strukturální podporu a stimuluje růst a diferenciaci buněk. Toto lešení je obvykle doplněno o růstové faktory a cytokiny, které podporují agregaci buněk a jejich organizaci do komplexních 3D struktur. (Cox et al., 2020) Matrigel se hojně využívá pro kultivaci, protože podporuje růst. Není vhodný pro výzkumy, které by generovaly „mikrojátra“ jako transplantát, jelikož imunitní systém by mohl reagovat na cizorodé částice. Proto se zkoumá využití kolagenového lešení místo Matrigelu. (Kim et al., 2023)

Organoid je konstruován na základě dynamické samoorganizace, která je řízena interakcemi mezi buňkami a kodiferencujícími buňkami. Unikátní vlastností jaterních organoidů je fakt, že se přestávají diferencovat, jakmile se projeví jaterní funkce – např. sekrece albuminu, ukládání glykogenu nebo metabolismus cholesterolu. Organoidy poskytují možnost podrobně studovat účinky léčiv, genové mutace a zároveň umožňují hodnocení tkáňové regenerace a udržení fyziologických funkcí. Ty můžeme sledovat přes biochemické markery a tumormarkery. (Sakabe et al., 2020)

Organoidy z dospělých hepatocytů mohou být kultivovány až 2,5 měsíce, ale kokultivace organoidů z iPSC-Heps a endoteliálními buňkami zlepšuje jaterní funkce a mohla by být vytvořena funkční síť žlučových kanálků. (Kammerer, 2021) Mezi další zdroje buněk pro tvorbu organoidů patří progenitory hepatocytů, fetální buňky nebo indukované pluripotentní buňky. (Sakabe et al., 2020; Salas-Silva et al., 2023; Hendriks et al., 2024) Bylo zahájeno několik pokusů o generování funkčně kompetentních hepatocytárních buněk z lidských jaterních organoidů, avšak žádný z těchto modelů nedosáhl úrovně jaterních funkcí pozorované u primárních lidských hepatocytů. Jedna z nejnovějších studií je zaměřena

na kultivaci jaterních organoidů odvozených z kryokonzervovaných PHH za použití HYDROX (chemicky definovaného 3D nanovláknitého systému). Ačkoliv byla v tomto prostředí potlačena proliferační schopnost organoidů, došlo k výraznému zvýšení exprese genů kódujících enzymy podílející se na metabolismu léčiv. (Tong et al., 2024)

V oblasti výzkumu jaterních buněk lze rozlišit tři hlavní typy organoidů: multitkáňové, epiteliální a multiorgánové. Multitkáňové organoidy, tvořené různými typy jaterních buněk včetně parenchymu, se generují z indukovaných pluripotentních kmenových buněk nebo spontánním uspořádáním jaterních buněk do sféroidu a nacházejí uplatnění v metabolických studiích. Epiteliální organoidy, vznikající z jedné zárodečné vrstvy, mají schopnost sebeobnovy a lze je vytvořit jak z pluripotentních kmenových buněk, tak z primární jaterní tkáně, např. z cholangiocytů či hepatocytů. Hepatocytové organoidy odvozené z fetálních buněk vykazují vlastnosti zralých hepatocytů, jsou geneticky modifikovatelné a využitelné při výzkumu metabolických onemocnění i při identifikaci nových terapeutických cílů. (Bonanini et al., 2024)

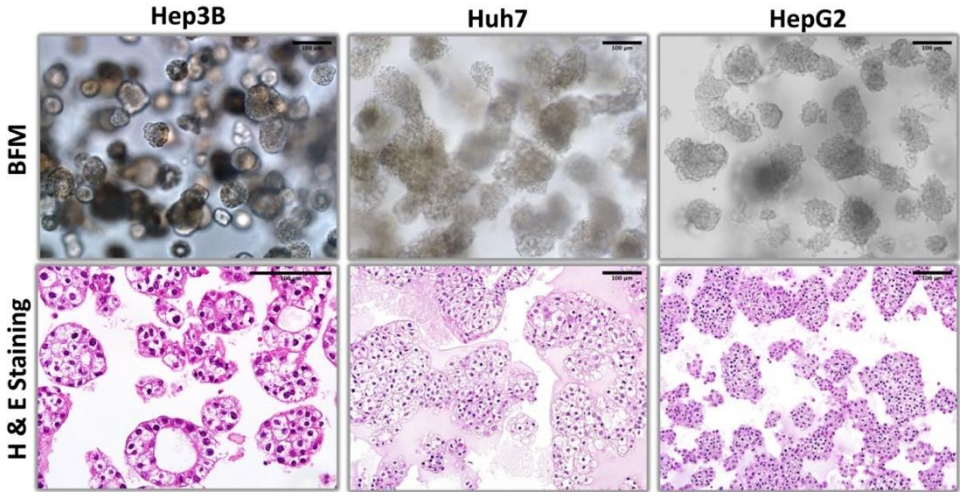
První úspěšná rekonstrukce jaterních organoidů byla provedena v roce 2013. Vědci tehdy dokázali kultivovat jaterní organoidy z Lgr5+ progenitorových buněk získaných z poškozených žlučovodů. Tyto organoidy si uchovaly jaterní vlastnosti i po dlouhodobé proliferaci a představovaly zásadní průlom v oblasti orgánových modelů *in vitro*. Později vznikly specifické modely pro jaterní metastázy, fibrózu, nádory, nealkoholické ztučnění jater, nealkoholickou steatohepatitidou i virové infekce. Dnes existují krátkodobé i dlouhodobé organoidy využívané pro výzkum a testování léčiv. Krátkodobé organoidy se udržují v kultuře po dobu maximálně 30 pasáží nebo tří měsíců a slouží zejména k nízkokapacitnímu testování léčiv, identifikaci biomarkerů a studiu mechanismů lékové citlivosti a rezistence. Oproti tomu dlouhodobé organoidy umožňují provádět rozsáhlý screening léčiv a slouží jako základ pro tvorbu rozsáhlých organoidních databází. Organoidy se dělí na tři základní skupiny:

- organoidy odvozené ze zdravých i nádorových tkání;
- organoidy odvozené z kmenových buněk;
- organoidy odvozené od pacientů. (Gong et al., 2025)

5.1 Organoidy z imortalizovaných buněk

Při porovnání nádorových buněčných linií lze pozorovat rozdílné velikosti vytvořených struktur i tvar buněk viz Obrázek 18. při barvení hematoxylin-eosin a rozdílnou expresi Ki67, CK18, CK7 a vimentinu i ve srovnání s expresí těchto proteinů za podmínek 2D Hep3B.

Z toho vyplývá, že zavedení těchto organoidových modelů poskytuje cenný nástroj pro zkoumání chování HCC buněk, testování nových terapeutických přístupů a lepší porozumění mechanismům nádorového růstu a metastáz. Tento přístup může přispět k vývoji personalizované medicíny a efektivnějších léčebných strategií pro pacienty s HCC. (Oz et al., 2021)



Obrázek 18. Porovnání tvorby organoidů u nádorových linií (převzato dle Oz et al., 2021)
BFM – mikroskopie ve světlém poli, HE – barvení hematoxylin-eosin

Alternativou k 3D jaterním sféroidům je tvorba biotištěných organoidů z buněčné linie hepatomu HepaRG, které slouží jako model „jater v misce“. Biolešení vytvořené ze specifické jaterní matrice poskytuje mikroprostředí přizpůsobené jaterním buňkám. Díky biologicky odbouratelné pryskyřici podporují lepší růst a vzájemné interakce jaterních buněk. Buňky kultivované na těchto nosičích vykazovaly výrazně lepší jaterní funkce včetně sekrece albuminu, syntézy močoviny a ukládání glykogenu. Dále byla zaznamenána vyšší metabolická aktivita enzymů CYP, efektivnější vylučování žluči a zvýšená exprese metabolických enzymů fází I a II, transportérů a jaderných receptorů. Ve všech parametrech převyšovaly buňky pěstované na biolešení buňky, které byly kultivované bez těchto nosičů. Tyto organoidy zůstávají životaschopné až 40 dní, vyvíjejí strukturu podobnou játrům a mohou být využity k modelování nealkoholické steatohepatitidy. Po expozici specifickému koktejlu se u nich rozvíjí steatóza, zánět a fibróza, tudíž jsou cenným nástrojem pro translační výzkum a testování terapeutických přístupů. (Kaur et al., 2023; Liu et al., 2023)

5.2 Organoidy z kmenových buněk

Pro tvorbu jaterních organoidů lze využít různých typů kmenových a progenitorových buněk, přičemž nejčastěji se uplatňují indukované pluripotentní kmenové buňky a mezenchymální kmenové buňky. iPSC lze reprogramovat z pacientských somatických buněk, což umožňuje

personalizovaný přístup ke studiu jaterních onemocnění a testování léčiv. Mezenchymální kmenové buňky mají schopnost imunomodulace a podpory regenerace, a nacházejí potenciál v buněčné terapii. Organoidy generované z těchto buněk slouží jako *in vitro* modely pro výzkum vývoje jater, patogeneze onemocnění (např. genetických poruch, virových infekcí) i pro testování léků a hodnocení toxicity. Kromě výzkumných aplikací mají organoidy potenciál také v regenerativní medicíně, např. pro opravu jaterní tkáně nebo podporu transplantace. Je zdůrazňováno, že i když tyto technologie mají značný terapeutický a diagnostický potenciál, je nutné dále zlepšit jejich standardizaci, funkční zralost a bezpečnost pro klinické využití. (Nikokiraki et al., 2022)

Většina protokolů pro diferenciaci lidských PSC vede k buňkám s fetálními vlastnostmi, nikoliv plně funkčním dospělým buňkám. Analýzy ukázaly, že hepatocyty odvozené z lidských PSC mají fetální identitu, přičemž mechanismy blokující přechod k dospělému fenotypu jsou nejasné. Analýzy hlavních komponent potvrdily progresivní proces vedoucí k hepatocytární identitě, ale divergence v expresi genů souvisejících s metabolismem xenobiotik, transportem žlučových kyselin a metabolismem lipidů brání získání dospělé funkce. Tento problém je pozorován i u jiných typů buněk generovaných z lidských pluripotentních kmenových buněk. (Wesley et al., 2022)

Fetální a diferencované hepatocyty vykazují růst spojený s metabolickými a proliferativními změnami, avšak jejich odpověď na podněty se liší. Organoidy odvozené z diferencovaných hepatocytů vykazují po vhodné stimulaci (např. IL6+FXRα) známky vyšší zralosti a jaterní specializace ve srovnání s organoidy z fetálních hepatocytů. Zatímco organoidy z fetálních hepatocytů jsou výhodné pro dlouhodobou kultivaci a snadněji proliferují, PHH organoidy po aktivaci lépe napodobují strukturu a funkci dospělých jaterních buněk – prokazují polarizaci, expresi jaterních markerů (např. ALB, CYP3A4, HNF4A) a morfologické znaky zralosti. Mají větší potenciál pro studium dospělých jaterních funkcí a aplikace ve farmakologii a toxikologii, přestože jejich kultivace je náročnější. (Hendriks et al., 2024)

5.3 Pacientské organoidy

Významný pokrok ve využití pacientských jaterních organoidů pro personalizovanou léčbu jaterních nádorů byl zaznamenán v roce 2024, když se podařilo úspěšně kultivovat organoidy z 66 chirurgicky odstraněných vzorků primárního jaterního karcinomu, přičemž bylo dosaženo 40,9% úspěšnosti. Mezi primární jaterní karcinomy se řadí nejčastěji hepatocelulární karcinom a intrahepatální cholangiokarcinom. Organoidy byly schopny udržet stabilní růst

a strukturu po dobu až tří měsíců, což umožnilo dlouhodobé testování léčiv. Molekulární analýzy, včetně celogenomového sekvenování a RNA sekvenování, odhalily vysokou shodu mezi organoidy a původními nádorovými tkáněmi i se sdílenými mutacemi v genu TP53 a podobných profilů genové exprese. Vysoká míra shody potvrzuje, že pacientské jaterní organoidy věrně odrážejí genetické a funkční vlastnosti původních nádorů. Praktická aplikace této technologie byla demonstrována na pacientovi s intrahepatálním cholangiokarcinomem, u kterého testování citlivosti organoidů na různé chemoterapeutické látky vedlo k výběru nejúčinnějšího léčebného režimu. Tento přístup zdůrazňuje potenciál pacientských jaterních organoidů jako nástroje pro personalizovanou medicínu umožňující přizpůsobení léčby individuálním genetickým profilům pacientů. Celkově studie potvrzuje, že pacientské jaterní organoidy představují slibný model pro vývoj personalizovaných terapií poskytujících realistický a dlouhodobě udržitelný systém pro testování léčiv a studium nádorové biologie. (Rao et al., 2024)

6. Využití 3D modelů

6.1 Testování toxicity léků

Lékem indukované poškození jater je jednou z nejčastějších příčin selhání léčiv ve fázi klinických studií i po jejich schválení. Játra hrají centrální roli v metabolismu cizorodých látek prostřednictvím enzymů cytochromu P450, které mohou některá léčiva přeměnit na reaktivní a toxické metabolity. Pokud tyto metabolity nejsou účinně detoxikovány, mohou vyvolat oxidační stres, poškození DNA, zánětlivou odpověď a buněčnou smrt. Mezi známé hepatotoxické léky patří např. acetaminofen (paracetamol), jehož toxicita je závislá na dávce, dále troglitazon, nefazodon, amiodaron, isoniazid nebo některá antiretrovirotika. (Serras et al., 2021)

Acetaminofen (paracetamol) je běžně používané analgetikum a antipyretikum. Při předávkování však může způsobit závažné poškození jater prostřednictvím svého toxického metabolitu N-acetyl-p-benzochinoniminu (NAPQI), který vyčerpává zásoby glutathionu a vede k nekróze hepatocytů. Tradiční diagnostické markery, ALT a AST, mají omezenou specificitu a citlivost. Nové biomarkery, komplexy acetaminofenu s proteiny, mikroRNA-122, cytokeratinem 18, cirkulující volnou DNA a dalšími, vykazují vyšší specificitu a umožňují dřívější detekci poškození jater. Tyto biomarkery nabízejí slibné možnosti pro včasnou diagnostiku a monitorování hepatotoxicity způsobené acetaminofenem i dalšími látkami. (Li et al., 2023)

Včasné odhalení léky indukovaného poškození jater je proto zásadní pro bezpečnost pacientů i úspěšnost vývoje nových léčiv. S ohledem na limitace tradičních 2D kultur (rychlá ztráta fenotypu a enzymatické aktivity hepatocytů) se v preklinickém hodnocení toxicity stále více uplatňují pokročilé 3D jaterní modely. Mezi nejvíce využívané patří sféroidy z primárních lidských hepatocytů, které si dlouhodobě udržují klíčové funkce jako syntézu albuminu, metabolismus léčiv či odpověď na toxiny. Dále jsou využívány organoidy, které vznikají z kmenových buněk a samoorganizují se do struktur připomínajících jaterní tkáň, nebo biotištěné jaterní modely, v nichž jsou různé typy jaterních buněk uspořádány do přesně definovaných 3D struktur. Nejsofistikovanějšími platformami jsou „orgány na čipu“, které kombinují více buněčných typů s mikrofluidikou a umožňují perfuzi média, čímž simulují skutečné dynamické prostředí jater. Všechny výše zmíněné modely vykazují vyšší predikční hodnotu pro hodnocení hepatotoxicity a umožňují detailní sledování reakcí na léčiva včetně změn v genové expresi, sekreci proteinů, tvorbě reaktivních metabolitů či narušení buněčné integrity. Díky dlouhodobé životaschopnosti buněk a možnosti opakovaného testování se

stávají klíčovým nástrojem nejen v toxikologii, ale také při vývoji personalizované medicíny, která zohledňuje genetickou variabilitu pacientů. Do budoucna představují potenciál pro snížení závislosti na zvířecích modelech, zvýšení přesnosti předklinického testování a urychlení vývoje bezpečnějších léčiv. (Serras et al., 2021)

Lidské jaterní sféroidy představují efektivní model pro screening léků při onemocněních jater, jelikož umožňují testování potenciálních inhibitorů po jejich vytvoření. Tímto způsobem lze analyzovat vývoj a důsledky metabolického poškození jater, díky čemuž jsou vhodným nástrojem pro vysoce výkonný screening terapeutických látek. Např. aplikace selektivních inhibitorů může vést ke snížení exprese fibrogenních markerů a proteinů, což potvrzuje jejich přínos při hodnocení terapeutické účinnosti. (Kim et al., 2024)

V nedávné studii byla popsána platforma využívající lidské jaterní organoidy odvozené z iPSC buněk, určená k hodnocení potenciální hepatotoxicity léčiv. Organoidy byly kultivovány ve vícejamkovém formátu i v mikrofluidním systému simulujícím funkční jaterní prostředí. Při vystavení různým léčivům, včetně acetaminofenu, se u modelu projevily typické známky toxického poškození – např. změny v produkci jaterních proteinů, zvýšená aktivita metabolických enzymů a známky buněčného stresu. V podmínkách „jater na čipu“ byly zaznamenány fenotypy odpovídající steatóze a poruchám mitochondriálních funkcí. To potvrzuje využitelnost přístupu pro testování léčiv z hlediska bezpečnosti a predikce jejich účinků na játra. (Zhang et al., 2023)

6.2 Buněčná terapie

V uplynulém desetiletí přinesla technologie organoidů významný pokrok ve vývoji modelů a materiálů, které podporují další rozvoj vědeckého výzkumu. Lidské jaterní organoidy představují inovativní *in vitro* kultivační systém, který po letech intenzivního vývoje je schopen věrně napodobit morfologii jater, metabolismus živin a léčiv, genovou expresi i sekreční funkce. Díky uvedeným vlastnostem slouží jako spolehlivý model pro studium jaterních onemocnění. Organoidy strukturně i funkčně odpovídají jaterní tkáni, což z nich činí slibnou alternativu k transplantaci jater a tím významně přispívají k cílům regenerativní medicíny. (Gong et al., 2025)

Významný pokrok v oblasti pacientských jaterních organoidů hraje dlouhodobá kultivace lidských dospělých hepatocytárních organoidů, které si zachovávají klíčové metabolické funkce jater. Kombinovaná aktivace signálních drah Wnt a STAT3 umožňuje dlouhodobé samoreplikace těchto organoidů, přičemž aktivace STAT3 pomocí onkostatinu M podporuje

proliferaci hepatocytů a zároveň brání jejich přeměně na cholangiocyty. Po transplantaci do myšího modelu byly tyto organoidy schopny repopulovat játra myší a obnovit metabolickou zonaci jaterní tkáně. Výzkum nabízí nový kultivační systém, který je slibný pro vývoj terapeutických strategií proti lidským jaterním onemocněním a má potenciál pro aplikaci v personalizované medicíně. (Igarashi et al., 2025)

Trojrozměrné kultury věrně napodobují genetické a molekulární charakteristiky původních nádorů (HCC a intrahepatálních cholangiokarcinomů) a umožňují tím detailní studium nádorové biologie, identifikaci biomarkerů a testování terapeutických látek. Inovativní přístupy („organoidy na čipu“ a kokultivační systémy) zvyšují fyziologickou relevanci těchto modelů. Navzdory pokrokům zůstává výzvou standardizace *in vitro* protokolů pro klinické využití. Celkově je zdůrazňován potenciál organoidů odvozených od pacienta v personalizované medicíně a vývoji cílených terapií pro pacienty s primárními jaterními nádory. (Qureshi et al., 2024)

Transplantace jaterních buněk je účinnou léčbou jaterního selhání způsobeného alkoholem, hepatotoxickými léky nebo virovými infekcemi. Její využití však omezuje nedostatek dárců, nízký počet vhodných buněk a omezená účinnost zákroku. Navíc jaterní buňky při kultivaci *in vitro* často ztrácejí schopnost se množit a to komplikuje jejich další použití. Tyto problémy byly do značné míry vyřešeny využitím lidských chemicky odvozených jaterních progenitorů, které mají proliferační a diferenciační potenciál a umožňují tvorbu buněčných vrstev. (Yang et al., 2022) Studie z roku 2023 provedená na myších představila vývoj jaterních organoidů odvozených z lidských chemicky indukovaných jaterních progenitorových buněk (hCdHOs) a jejich srovnání s PHH. Výzkum ukazuje, že hCdHOs vykazují vyšší expresi jaterních markerů, jako jsou albumin a enzymy CYP, a zvýšenou sekreci močoviny ve srovnání s PHH. Navíc hCdHOs prokázaly lepší schopnost diferenciace směrem k hepatocytům a vyšší citlivost na toxické látky, což je činí vhodnými pro modelování jaterních onemocnění a testování hepatotoxicity. Tyto výsledky naznačují, že hCdHOs představují slibnou alternativu k PHH pro aplikace v oblasti regenerativní medicíny a farmakologického výzkumu. (Salas-Silva et al., 2023)

Technologie CRISPR/Cas9 přináší nové možnosti v úpravě jaterních organoidů, protože umožňuje přesnou editaci genů na molekulární úrovni. Díky tomu lze opravovat genetické vady nebo vkládat specifické funkční geny, čímž se zvyšuje terapeutický potenciál buněk. Geneticky upravené organoidy se lépe přizpůsobují prostředí pacienta, snižují riziko imunitního odmítnutí a zároveň podporují regeneraci jater. Tyto buňky lze navíc množit *ex vivo*

a následně transplantovat, kde pokračují v růstu a funkci bez nutnosti dlouhodobé kultivace. (Gong et al., 2025)

Transplantace jaterních organoidů se v posledních letech stala klíčovým tématem regenerativní medicíny a vykazuje slibné výsledky na různých zvířecích modelech. U myší s akutním poškozením jater se výrazně zvýšilo přežití a funkčnost jater po transplantaci organoidů vytvořených z endodermálních, endoteliálních a mezenchymálních buněk odvozených z lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk, které byly získány z pupečníku. Tím se otevírá cesta k vývoji personalizovaných terapií. Lidské somatické buňky akumulují jaderné a mitochondriální genomové mutace v průběhu svého života, takže se očekává, že u novorozence nebude tolik mutací jako u dospělého. (Nie et al., 2018) Na myším modelu post-hepatektomického selhání jater byly transplantovány proliferující lidské hepatocyty zapouzdřené v organoidech do peritoneální dutiny. Tento přístup vedl ke zlepšení regenerace jater, snížení hladin endotoxinů a amoniaku a k prodloužení přežití, což naznačuje možnost akutní podpory jaterní funkce v klinické praxi. (Yuan et al., 2024) V roce 2020 bylo vyvinuto 3D porézní lešení bez využití zvířecího modelu s buňkami HepG2, které zajišťuje rovnoměrné rozložení buněk a podporuje jejich přežití po dobu delší než 7 dní, což je klíčové pro budoucnost klinické aplikace organoidů. (Labour et al., 2020)

V případě traumatického poškození jater po úrazu nebo operaci, mohou jaterní organoidy nebo z nich odvozené hepatocyty urychlit regeneraci jaterní tkáně a zlepšit prognózu. U pacientů s genetickými poruchami, např. hemochromatóza nebo Wilsonova choroba, organoidy umožňují simulovat účinky přetížení železem či mědí a současně slouží jako platforma pro testování léčebných přístupů i náhradu poškozené tkáně. V případě autoimunitní hepatitidy mohou jaterní organoidy podpořit regeneraci jaterní tkáně, omezit zánět a zpomalit progresi fibrózy. Díky možnosti jejich získání z vlastních buněk pacienta představují i potenciálně bezpečný a účinný způsob léčby bez nutnosti imunosuprese. Integrace jaterních organoidů do bioumělých jater spočívá v jejich nahrazení za klasické jaterní buňky v umělém zařízení a propojení s funkcemi – filtrace, detoxikace či adsorpce. Tento hybridní systém simuluje přirozené funkce jater, zpracovává živiny a toxiny přes polopropustnou membránu a vrací očištěnou krev zpět do těla podobně jako hemodialýza u ledvin. Organoidy díky své buněčné komplexitě a funkčnosti napodobují skutečnou jaterní tkáň, čímž zvyšují efektivitu terapie a snižují riziko odmítnutí. Navíc umožňují před implantací přesné sledování jejich aktivity, což zajišťuje bezpečnost a účinnost léčby. (Gong et al., 2025)

Závěr

Jaterní sféroidy a organoidy představují klíčové nástroje moderního *in vitro* modelování jaterních funkcí, patologií i odezvy na léčiva, přičemž každý z těchto 3D modelů nabízí specifické výhody i omezení. Sféroidy, často tvořené z primárních hepatocytů nebo buněčných linií, se vyznačují jednoduchou přípravou, stabilní funkcí a dobrou opakovatelností, a jsou tak široce využívány zejména pro testování hepatotoxicity a metabolických vlastností léčiv. Organoidy naopak umožňují složitější samoorganizaci více buněčných typů, čímž lépe napodobují architekturu a funkční heterogenitu jaterní tkáně. Vynikají proto zejména ve studiích vývoje, genetických onemocnění a modelování komplexních jaterních poruch.

Mezi hlavní nevýhody sféroidů patří jejich omezená buněčná různorodost a relativně jednodušší struktura, zatímco u organoidů bývá výzvou časová i technická náročnost, potřeba standardizace a nižší reprodukovatelnost mezi laboratořemi. Technologie jaterních organoidů představuje významný milník v oblasti regenerativní medicíny a nabízí nadějné řešení pro léčbu jaterních onemocnění, zejména v kontextu omezené dostupnosti dárcovských orgánů. Díky schopnosti napodobovat jak strukturu, tak i funkci jaterní tkáně, mají organoidy potenciál nejen pro náhradu jaterních funkcí, ale i pro podporu regenerace poškozené tkáně. Jejich kombinace s moderními technologiemi CRISPR/Cas9, 3D biotisk nebo pokročilé biomateriály dále rozšiřuje možnosti jejich využití. Ačkoli klinické aplikace zatím zůstávají ve fázi předklinického výzkumu a byly dosud ověřeny pouze na zvířecích modelech, očekává se, že další vývoj povede k bezpečnějším, přesnějším a personalizovaným terapiím.

Z dlouhodobého hlediska se očekává další pokrok v oblasti kombinovaných 3D systémů, které by spojily výhody sféroidů i organoidů. Spolu s rostoucím důrazem na personalizovanou medicínu, etické nahrazení zvířecích modelů a vývoj nových léčiv představují jaterní sféroidy a organoidy jednu z nejperspektivnějších cest současného i budoucího biomedicínského výzkumu.

POUŽITÁ LITERATURA

Alberts B, Heald R, Johnson AD, et al (2022) Molecular biology of the cell. W. W. Norton & Company, 7. vydání, s. 477, 480, ISBN: 9780393884845, 9780393884630 (ekniha).

Altaf B, Rehman A, Jawed S, et al (2020) Association of liver biomarkers and cytokeratin-18 in Nonalcoholic fatty liver disease patients: Nonalcoholic fatty liver disease. Pak J Med Sci 36. https://doi.org/10.12669/pjms.36.3.1674.

Ardisasmita AI, Schene IF, Joore IP, et al (2022) A comprehensive transcriptomic comparison of hepatocyte model systems improves selection of models for experimental use. Commun Biol 5:1094. https://doi.org/10.1038/s42003-022-04046-9.

Arez F, Preiss L, Gal IR, et al (2025) Heterotypic spheroids as a strategy for 3D culture of cryopreserved primary human hepatocytes in stirred-tank systems. SLAS Discovery 31:100210. https://doi.org/10.1016/j.slasd.2025.100210.

Arzumanian V, Pyatnitskiy M, Poverennaya E (2023) Comparative transcriptomic analysis of three common liver cell lines. IJMS 24:8791. https://doi.org/10.3390/ijms24108791.

Bachmann A, Moll M, Gottwald E, et al (2015) 3D cultivation techniques for primary human hepatocytes. Microarrays 4:64–83. https://doi.org/10.3390/microarrays4010064.

Bell CC, Hendriks DFG, Moro SML, et al (2016) Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. Sci Rep 6:25187. https://doi.org/10.1038/srep25187.

Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, et al (2011) Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: A one hundred liver experience. PLoS ONE 6:e18222. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018222.

Bonanini F, Singh M, Yang H, et al (2024) A comparison between different human hepatocyte models reveals profound differences in net glucose production, lipid composition and metabolism in vitro. Experimental Cell Research 437:114008. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2024.114008.

Brenner DA (2025) Alternatives to animal testing to assess MASH drugs and hepatotoxicity. Hepatology 81:304–311. https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000669.

Bronsard J, Savary C, Massart J, et al (2024) 3D multi-cell-type liver organoids: A new model of non-alcoholic fatty liver disease for drug safety assessments. Toxicology in Vitro 94:105728. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105728.

Carotti S, Morini S, Carpino G, et al (2020) Liver histology. In: Radu-Ionita F, Pyrsopoulos NT, Jinga M, et al. (eds) Liver Diseases. Springer International Publishing, Cham 17–28. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24432-3_2.

Close DA, Johnston PA (2025) Miniaturization and characterization of patient derived hepatocellular carcinoma tumor organoid cultures for cancer drug discovery applications. SLAS Discovery 30:100201. https://doi.org/10.1016/j.slasd.2024.100201.

Cox CR, Lynch S, Goldring C, et al (2020) Current perspective: 3D spheroid models utilizing human-based cells for investigating metabolism-dependent drug-induced liver injury. Front Med Technol 2:611913. https://doi.org/10.3389/fmedt.2020.611913.

Crouchet E, Almeida N, Durand SC, et al (2025) A patient-derived HCC spheroid system to model the tumor microenvironment and treatment response. JHEP Reports 7:101252. https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2024.101252.

Franzén O (2019) PanglaoDB: A web server for exploration of mouse and human single-cell RNA sequencing data [databáze vycházející z: Franzén O, Gan L-M, Björkegren JLM (2019) Nucleic Acids Res 47(D1):D881–D885. https://doi.org/10.1093/nar/gky997]. Dostupné z: https://panglaodb.se/ (Citováno: 2025-03-30).

Gandhi N, Wills L, Akers K, et al (2024) Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of induced pluripotent stem cell hepatocyte-like cells and primary human hepatocytes. Cell Tissue Res 396:119–139. https://doi.org/10.1007/s00441-024-03868-9.

Gao X, Liu Y (2017) A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines. Cell Biol Toxicol 33:407–421. https://doi.org/10.1007/s10565-017-9383-z.

Gong D, Mo J, Zhai M, et al (2025) Advances, challenges and future applications of liver organoids in experimental regenerative medicine. Front Med 11:1521851. https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1521851.

Green CJ, Charlton CA, Wang L-M, et al (2017) The isolation of primary hepatocytes from human tissue: optimising the use of small non-encapsulated liver resection surplus. Cell Tissue Bank 18:597–604. https://doi.org/10.1007/s10561-017-9641-6.

Gupta R, Schrooders Y, Hauser D, et al (2021) Comparing in vitro human liver models to in vivo human liver using RNA-Seq. Arch Toxicol 95:573–589. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02937-6.

Hart SN, Li Y, Nakamoto K, et al (2010) A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. Drug Metabolism and Disposition 38:988–994. https://doi.org/10.1124/dmd.109.031831.

Hendriks D, Artegiani B, Margaritis T, et al (2024) Mapping of mitogen and metabolic sensitivity in organoids defines requirements for human hepatocyte growth. Nat Commun 15:4034. https://doi.org/10.1038/s41467-024-48550-4.

Horner R, Gassner JGMV, Kluge M, et al (2019) Impact of Percoll purification on isolation of primary human hepatocytes. Sci Rep 9:6542. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43042-8.

Cherradi S, Roux S, Dupuy M, et al (2025) Modelling hepatocellular carcinoma microenvironment phenotype to evaluate drug efficacy. Sci Rep 15:1179. https://doi.org/10.1038/s41598-024-84304-4.

Ianevski A (2022) SCTYPE: Compound sensitivity classification database [databáze vycházející z: Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T (2022) Nat Commun 13:1246. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28803-w]. Dostupné z: https://sctype.app/database.php (Citováno: 2025-03-30).

Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T (2022) Fully-automated and ultra-fast cell-type identification using specific marker combinations from single-cell transcriptomic data. Nat Commun 13:1246. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28803-w.

Igarashi R, Oda M, Okada R, et al (2025) Generation of human adult hepatocyte organoids with metabolic functions. Nature. https://doi.org/10.1038/s41586-025-08861-y.

Kammerer S (2021) Three-dimensional liver culture systems to maintain primary hepatic properties for toxicological analysis in vitro. IJMS 22:10214. https://doi.org/10.3390/ijms221910214.

Kanebratt KP, Janefeldt A, Vilén L, et al (2021) Primary human hepatocyte spheroid model as a 3D in vitro platform for metabolism studies. Journal of Pharmaceutical Sciences 110:422–431. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.10.043.

Kang SWS, Cunningham RP, Miller CB, et al (2024) A spatial map of hepatic mitochondria uncovers functional heterogeneity shaped by nutrient-sensing signaling. Nat Commun 15:1799. https://doi.org/10.1038/s41467-024-45751-9.

Kaur I, Vasudevan A, Rawal P, et al (2023) Primary hepatocyte isolation and cultures: Technical aspects, challenges and advancements. Bioengineering 10:131. https://doi.org/10.3390/bioengineering10020131.

Kiamehr M, Heiskanen L, Laufer T, et al (2019) Dedifferentiation of primary hepatocytes is accompanied with reorganization of lipid metabolism indicated by altered molecular lipid and miRNA profiles. IJMS 20:2910. https://doi.org/10.3390/ijms20122910.

Kim HY, Lee W, Liu X, et al (2024) Protocol to generate human liver spheroids to study liver fibrosis induced by metabolic stress. STAR Protocols 5:103111. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103111.

Kim M, Kim Y, Silva ESS, et al (2023) Enhancing generation efficiency of liver organoids in a collagen scaffold using human chemically derived hepatic progenitors. Ann Hepatobiliary Pancreat Surg 27:342–349. https://doi.org/10.14701/ahbps.23-052.

Klein K, Tremmel R, Winter S, et al (2019) A new panel-based next-generation sequencing method for ADME genes reveals novel associations of common and rare variants with expression in a human liver cohort. Front Genet 10:7. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00007.

Labour M-N, Le Guilcher C, Aid-Launais R, et al (2020) Development of 3D hepatic constructs within polysaccharide-based scaffolds with tunable properties. IJMS 21:3644. https://doi.org/10.3390/ijms21103644.

Lee S-Y, Hwang HJ, Lee DW (2022) Optimization of 3D-aggregated spheroid model (3D-ASM) for selecting high efficacy drugs. Sci Rep 12:18937. https://doi.org/10.1038/s41598-022-23474-5.

Li X, Ni J, Chen L (2023) Advances in the study of acetaminophen-induced liver injury. Front Pharmacol 14:1239395. https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1239395.

Liu X, Lam K, Zhao H, et al (2023) Isolation of primary human liver cells from normal and nonalcoholic steatohepatitis livers. STAR Protocols 4:102391. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102391.

López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, et al (2009) HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line. Human Pathology 40:1512–1515. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.003.

Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, et al (2005) New insights into functional aspects of liver morphology. Toxicol Pathol 33:27–34. https://doi.org/10.1080/01926230590881826.

Mandon M, Huet S, Dubreil E, et al (2019) Three-dimensional HepaRG spheroids as a liver model to study human genotoxicity in vitro with the single cell gel electrophoresis assay. Sci Rep 9:10548. https://doi.org/10.1038/s41598-019-47114-7.

Martínez-Torres D, Maldonado V, Pérez-Gallardo C, et al (2024) Phenotypic characterization of liver tissue heterogeneity through a next-generation 3D single-cell atlas. Sci Rep 14:2823. https://doi.org/10.1038/s41598-024-53309-4.

Molina-Jimenez F, Benedicto I, Dao Thi VL, et al (2012) Matrigel-embedded 3D culture of Huh-7 cells as a hepatocyte-like polarized system to study hepatitis C virus cycle. Virology 425:31–39. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.021.

Morciano G, Imamura H, Patergnani S, et al (2020) Measurement of ATP concentrations in mitochondria of living cells using luminescence and fluorescence approaches. In: Methods in Cell Biology. Elsevier 199–219. https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.10.007.

Nie Y-Z, Zheng Y-W, Ogawa M, et al (2018) Human liver organoids generated with single donor-derived multiple cells rescue mice from acute liver failure. Stem Cell Res Ther 9:5. https://doi.org/10.1186/s13287-017-0749-1.

Nikokiraki C, Psaraki A, Roubelakis MG (2022) The potential clinical use of stem/progenitor cells and organoids in liver diseases. Cells 11:1410. https://doi.org/10.3390/cells11091410.

Oz O, Iscan E, Batur T, et al (2021) 3D organoid modelling of hepatoblast-like and mesenchymal-like hepatocellular carcinoma cell lines. HR. https://doi.org/10.20517/2394-5079.2021.43.

Peng Z, Wu J, Hu S, et al (2022) Requirments for primary human hepatocyte. Cell Proliferation 55:e13147. https://doi.org/10.1111/cpr.13147.

Pfeiffer E, Kegel V, Zeilinger K, et al (2015) Featured article: Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. Exp Biol Med (Maywood) 240:645–656. https://doi.org/10.1177/1535370214558025.

Qureshi AA, Wehrle CJ, Ferreira-Gonzalez S, et al (2024) Tumor organoids for primary liver cancers: A systematic review of current applications in diagnostics, disease modeling, and drug screening. JHEP Reports 6:101164. https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2024.101164.

Rao J, Song C, Hao Y, et al (2024) Leveraging patient-derived organoids for personalized liver cancer treatment. Int J Biol Sci 20:5363–5374. https://doi.org/10.7150/ijbs.96317.

Rebelo SP, Costa R, Silva MM, et al (2017) Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: Improved functionality in long-term bioreactor cultures: 3D co-cultures of human hepatocytes and MSCs in bioreactors. J Tissue Eng Regen Med 11:2034–2045. https://doi.org/10.1002/term.2099.

Rentschler S, Doss S, Kaiser L, et al (2024) Metabolic biomarkers of liver failure in cell models and patient sera: Toward liver damage evaluation in vitro. IJMS 25:13739. https://doi.org/10.3390/ijms252413739.

Rose S, Ezan F, Cuvellier M, et al (2021) Generation of proliferating human adult hepatocytes using optimized 3D culture conditions. Sci Rep 11:515. https://doi.org/10.1038/s41598-020-80019-4.

Royo F, Garcia-Vallicrosa C, Azparren-Angulo M, et al (2024) Three-dimensional hepatocyte spheroids: Model for assessing chemotherapy in hepatocellular carcinoma. Biomedicines 12:1200. https://doi.org/10.3390/biomedicines12061200.

Runser S, Vetter R, Iber D (2024) SimuCell3D: Three-dimensional simulation of tissue mechanics with cell polarization. Nat Comput Sci 4:299–309. https://doi.org/10.1038/s43588-024-00620-9.

Sakabe K, Takebe T, Asai A (2020) Organoid medicine in hepatology. Clinical Liver Disease 15:3–8. https://doi.org/10.1002/cld.855.

Salas-Silva S, Kim Y, Kim TH, et al (2023) Human chemically-derived hepatic progenitors (hCdHs) as a source of liver organoid generation: Application in regenerative medicine, disease modeling, and toxicology testing. Biomaterials 303:122360. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122360.

Saxton SH, Stevens KR (2023) 2D and 3D liver models. Journal of Hepatology 78:873–875. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.022.

Serras AS, Rodrigues JS, Cipriano M, et al (2021) A critical perspective on 3D liver models for drug metabolism and toxicology studies. Front Cell Dev Biol 9:626805. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.626805.

Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, et al (2007) Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. The Journal of Experimental Medicine 204:1973–1987. https://doi.org/10.1084/jem.20061603.

Simian M, Bissell MJ (2017) Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. Journal of Cell Biology 216:31–40. https://doi.org/10.1083/jcb.201610056.

Song Y, Kim J-S, Kim S-H, et al (2018) Patient-derived multicellular tumor spheroids towards optimized treatment for patients with hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res 37:109. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0752-0.

Sorenson RL, Brelje TC. Liver – human liver lobule (slide MH 126b). [online atlas]. Histology Guide. Chicago, Illinois: Loyola University Chicago, datum publikování: 2005. Datum revize: 2024. Dostupné z: https://histologyguide.com/slideview/MH-126b-liver/15-slide-1.html (Citováno: 2025-05-02).

Štampar M, Žegura B (2024) In vitro hepatic 3D cell models and their application in genetic toxicology: A systematic review. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 900:503835. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2024.503835.

Tascher G, Burban A, Camus S, et al (2019) In-depth proteome analysis highlights HepaRG cells as a versatile cell system surrogate for primary human hepatocytes. Cells 8:192. https://doi.org/10.3390/cells8020192.

Taurin S, Alzahrani R, Aloraibi S, et al (2025) Patient-derived tumor organoids: A preclinical platform for personalized cancer therapy. Translational Oncology 51:102226. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2024.102226.

Tong Y, Ueyama-Toba Y, Yokota J, et al (2024) Efficient hepatocyte differentiation of primary human hepatocyte-derived organoids using three dimensional nanofibers (HYDROX) and their possible application in hepatotoxicity research. Sci Rep 14:10846. https://doi.org/10.1038/s41598-024-61544-y.

Ware BR, Durham MJ, Monckton CP, et al (2018) A cell culture platform to maintain long-term phenotype of primary human hepatocytes and endothelial cells. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology 5:187–207. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.11.007.

Wesley BT, Ross ADB, Muraro D, et al (2022) Single-cell atlas of human liver development reveals pathways directing hepatic cell fates. Nat Cell Biol 24:1487–1498. https://doi.org/10.1038/s41556-022-00989-7.

Wiśniewski JR, Wegler C, Artursson P (2016) Subcellular fractionation of human liver reveals limits in global proteomic quantification from isolated fractions. Analytical Biochemistry 509:82–88. https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.006.

Xu Q (2021) Human three-dimensional hepatic models: Cell type variety and corresponding applications. Front Bioeng Biotechnol 9:730008. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.730008.

Yang S, Ooka M, Margolis RJ, et al (2023) Liver three-dimensional cellular models for high-throughput chemical testing. Cell Reports Methods 3:100432. https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2023.100432.

Yang W, Wang X, Wang Z (2022) Engineered liver tissue in vitro to mimic liver functions and its biomedical applications. Mater Adv 3:4132–4154. https://doi.org/10.1039/D2MA00144F.

Yuan X, Wu J, Sun Z, et al (2024) Preclinical efficacy and safety of encapsulated proliferating human hepatocyte organoids in treating liver failure. Cell Stem Cell 31:484-498.e5. https://doi.org/10.1016/j.stem.2024.02.005.

Zaki MYW, Shetty S, Wilkinson AL, et al (2021) A three-dimensional spheroid model to investigate the tumor-stromal interaction in hepatocellular carcinoma. Journal of Visualized Experiments (JoVE) e62868. https://doi.org/10.3791/62868.

Zhang CJ, Meyer SR, O'Meara MJ, et al (2023) A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction. Journal of Hepatology 78:998–1006. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.01.019.

Zhang X (2018) CellMarker: A manually curated resource of cell markers in human and mouse [databáze vycházející z: Zhang X, Lan Y, Xu J, et al. (2019) Nucleic Acids Res 47(D1):D721–D728. https://doi.org/10.1093/nar/gky900]. Dostupné z: http://xteam.xbio.top/CellMarker/ (Citováno: 2025-03-30).

INTERNETOVÉ DATABÁZE

ATCC. Hep G2 (ATCC® HB-8065™). [online databáze]. ATCC – American Type Culture Collection. Manassas, Virginia: ATCC, datum publikování: neuvedeno. Datum revize: 2024. Dostupné z: https://www.atcc.org/products/hb-8065. (Citováno: 2025-03-31).

ATCC. Hep 3B (ATCC® HB-8064™). [online databáze]. ATCC – American Type Culture Collection. Manassas, Virginia: ATCC, datum publikování: neuvedeno. Datum revize: 2024. Dostupné z: https://www.atcc.org/products/hb-8064. (Citováno: 2025-04-01).

Elsevier. Human umbilical vein endothelial cell. [online databáze]. ScienceDirect – Topics in Neuroscience. Amsterdam: Elsevier, datum publikování: neuvedeno. Datum revize: 2025. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/human-umbilical-vein-endothelial-cell. (Citováno: 2025-05-19).

Elsevier. Organoid. [online databáze]. ScienceDirect – Topics in Agricultural and Biological Sciences. Amsterdam: Elsevier, datum publikování: neuvedeno. Datum revize: 2025. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/organoid. (Citováno: 2025-03-30).

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A: Specifické markery jaterní populace 69

Příloha B: Hierarchická shluková analýza exprese genů enzymů u HepG2, HepaRG, PHH a kousků jater 70

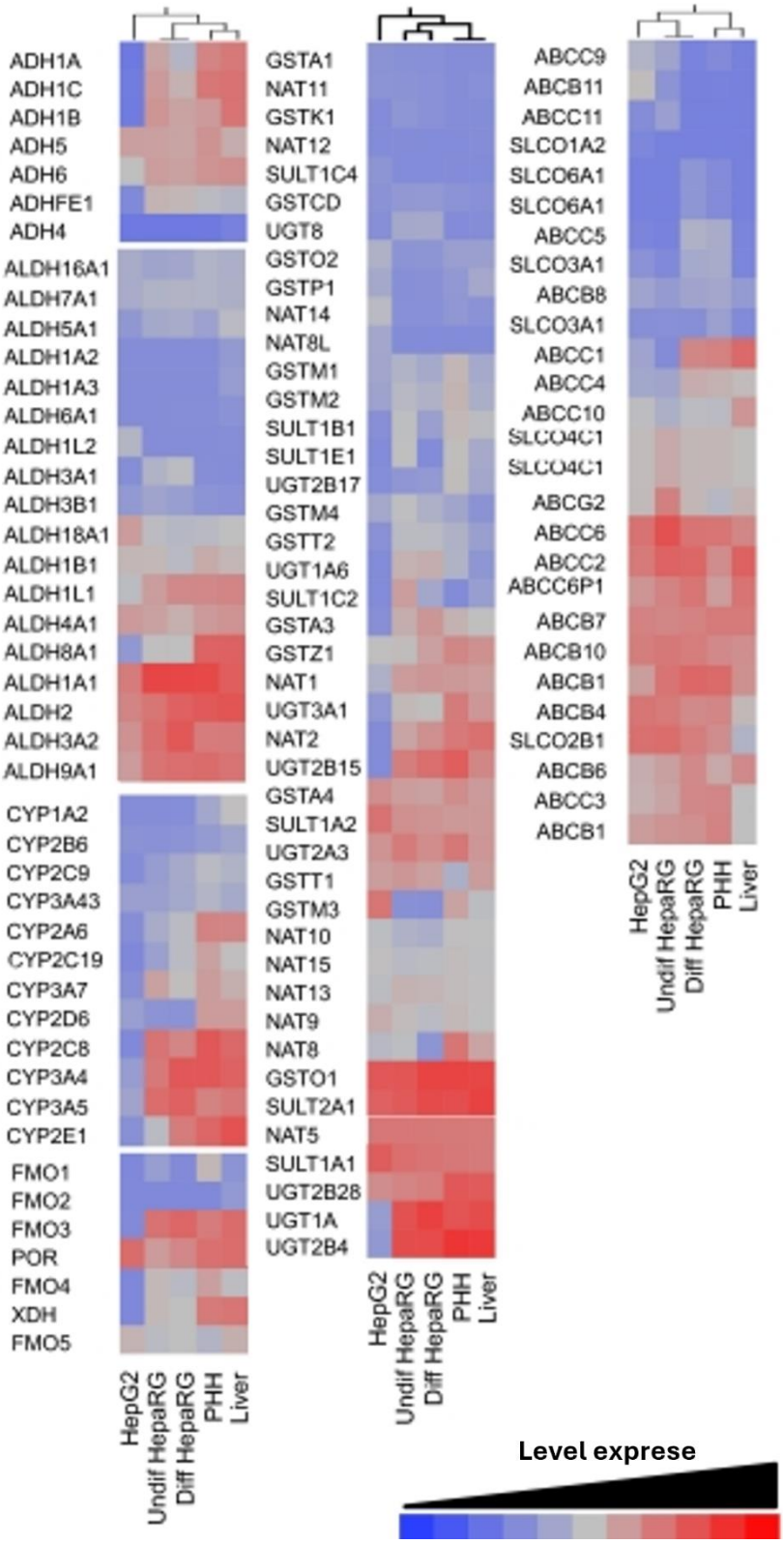
PŘÍLOHY

Příloha A:

Markery jaterních buněk	
Cholangiocyty	SSTR2,SLC4A2,KRT7,KCNN2,ITGB4,GGT6,CFTR,AQP4,AQP1,PIGR,GGT1,JAG1, GPBAR1,GGT7,KRT19,ONECUT2,ALPL,HNF1B,ALB,AGR2,TFF3,TFF1,SOX9,EPCAM, CLDN4,MMP7,TFF2,SCGB3A1,FXYD2,DEFB1,CD24,LCN2,CXCL1,CXCL6,LGALS2, TACSTD2,ELF3,SPP1,MUC5B,LGALS4,KRT8
Endoteliální buňky	FLT1,APPBP2,ARGLU1,ATP10D,BNIP1,BST2,BTNL9,C11orf96,CCDC85B,CCL14,CD4, CDC73,CDKL1,CHD4,CLEC1B,CLEC2B,CLEC4G,CLEC4M,CRBN,CRHBP,CTSL,DCLRE1C, DIPK2A,DLC1,DLG1,DLK1,DLK1,DNASE1L3,DOCK1,DUSP5,EFNB2,ENG,F8,FCN2,FCN3, FILIP1,FOSB,FXYD6,GBP4,GGA2,GNG11,HES1,HYI,IL1R1,IL33,KDR,KIF1B,KLHL28,LDB2, MCAM,MCM3AP,MEF2C,MFN1,MGAT5,MPZL3,MRC1,OIT3,PIK3C2A,PPWD1,PTPRC, RASGEF1B,RASGRP3,RELN,RIN2,SECISBP2L,STAB1,STRN3,TCF12,TEX264,TFRC, TRAPPC11,TSPAN7,USP48,VWF,ZNF286B,STAB2,CD34,PECAM1
Hematopoetická buňka	CD34,PTPRC
Jaterní hvězdicovité buňky	CYGB,PPARG,PDGFRA,RGS5,PPARA,FOXF1,ALB,NR1H4,CCN2,SEMA7A,WT1,FGF10, GFAP,NGFR,VEGFA,ACTA2,MYB,DES,FAP,SLC8A1,RELN,SYP,VCL,TIMP1,COL1A1, TAGLN,COL1A2,COL3A1,SPARC,RBP1,DCN,MYL9,TPM2,MEG3,BGN,IGFBP7,IGFBP3, CCN1,OLFML3,IGFBP6,CCL2,COLEC11,HGF
Hepatoblasty	AFP,ALB,CEBPA,KRT14,DLK1,CDH1,FOXM1,GGT1,HNF4A,PROX1,MAP2K4,SMAD5, KRT18,KRT8,HNF1B,HHEX,MET
Hepatocyty	AFP,HNF4A,KRT8,ALB,KRT18,FOSL1,EPPK1,UCP2,GCK,LRP5,SLC10A1,NOS2,ATP7B, GJB2,FGFR4,PROX1,CRP,SLC2A2,TFR2,KIF13B,LIPC,VDR,ASGR1,ARG1,G6PC,OTC, SERPINA1,ZHX2,HHEX,FOXA3,FOXA2,FOXA1,CYP2E1,CYP1A2,CEBPA,CDH1,GPC3, AHR,CPS1,GLS2,PCK1,TAT,WT1,PRRG4,SULT1A1,APOH,CTNNB1,ABCC3,FGB,AQP3, PLSCR1,FGA,APOB,ANG,ANXA13,SAT2, SFRP5,A1CF,APOA1,BNIP3,FGL1,PAH,SERPINA6,APOA2,AZGP1,FGG,APOC3,DEFB1, TM4SF4,GC,AMBP,ORM1,TTR,HAL,ASS1,SCD,HMGCS1,ACSS2,TM7SF2,SEC16B,SLBP, RND3,BCHE,GHR,ALDH6A1,MASP2,AKR1C1,HAMP,GLUL,ACLY,ASL,TMEM97,CP,SLPI, ACAT2,TM4SF5,MSMO1,LEPR,RCAN1,AR,RPP25L,HSD11B1,APOM,TKFC,G0S2,PON3, C1orf53,TTC36,FST,MCC,AQP9,GSTA2, NNT,SAA4,MRPS18C,OCIAD1,APOA5,ENTPD5,C4B,EID2,TP53INP2,ATIC,SERPINH1, SAMD5,GRB14,CD3G,RHOB,EPB41L4B,GPAT4,SPTBN1,SDC2,PHLDA1,WTAP,ACADM
Buňky imunitního systému	CD19,MS4A1,IL2RA,PTPRC,CD4,CD8A,CD3D,CD3E,CD3G,CD11c,CD14,CD16,CD56, CD16,CD42b,CD7,CD8,IgD,CD38,CD24,CD20,CD14,CD16,HLA-DR, CD11b,CD11c,CD123,CD15,CD33,CD66b,CD38,CD27,CD94,CD45
Kupfferovy buňky	CD14,CD68,TNF,LYZ,MPO,VSIG4,PROK2,STARD5,MSR1,PPARA,TREM1,SLC11A1, MMP13,VDR,CHIT1,OSM,PPARD,CLEC4F,ADGRE1,IL1B,SLC40A1,G6PD,TIMD4,MNDA, SLC15A3,DNASE1L3,MARCO,HFE,CD38,CD163,CCR5,CLEC1B,CLEC4G,GPIHBP1,FOLR2, PLTP,FTL,IRF7,SPIC,CSF1R,C1QC,C1QA,C1QB,CLEC4E
Jaterní progenitorová buňka	KRT7,KRT19
Žírné buňky	SADA,ENPP3,IL2RA,ISG20,SLC18A2,CD9,FCER1A,TPSB2,FCER2
Mezenchymální kmenová buňka	CD44,ENG,NT5E,ITGB1,THY1
Monocyty	FCGR3A,FCGR3B,CD14,Elane1

Příloha A: Specifické markery jaterní populace (převzato a upraveno dle Ianevski et al., 2022 - sc-type. Dostupné z: https://sctype.app/database.php (Citováno: 2025-03-30))
Seznam markerů odpovídá běžně používaným zkratkám ve specializované literatuře

Příloha B:



Příloha B: Hierarchická shluková analýza exprese genů enzymů u HepG2, HepaRG, PHH a kousků jater (převzato dle Hart et al., 2010)

Exprese genů enzymů metabolizujících léčiva fáze I (ADH, ALDHs, P450s a FMO), genů enzymů metabolizujících léčiva fáze II (GST, NATs, SULTs a UGTs) a genů membránových transportérů (ABCBs, ABCCs, ABCG a SLCOs)