

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

Nicol Stará

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Nové trendy v kultivaci kmenových buněk
Bakalářská práce

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikol Stará**
Osobní číslo: **C22243**
Studijní program: **B0914P360019 Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Nové trendy v kultivaci kmenových buněk**
Téma práce anglicky: **New Trends in Stem Cell Cultures**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- Zaměřte se na nejnovější pokroky v kultivačních technikách, včetně využití organoidů, bioreaktorů, nanotechnologií a inovativních materiálů.
- Diskutujte význam indukovaných pluripotentních kmenových buněk a jejich přípravu, význam genetických a molekulárních přístupů, včetně CRISPR a epigenetických modifikací pro buněčné modely.
- Podrobně popište roli automatizovaných systémů, robotizace, umělé inteligence a strojového učení v optimalizaci kultivačních procesů a monitorování buněčného chování. Vysvětlete potenciál využití umělé inteligence v analýze buněčného chování v budoucnosti.
- Bakalářskou práci přehledně zpracujte, použijte obrázky a schémata. Ke zpracování kompila-
ce 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**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem *Nové trendy v kultivaci kmenových buněk* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 25. června 2025

Nikol Stará

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce Mgr. Lence Šmíd, Ph.D. za vstřícný přístup, trpělivost a cenné rady. Také bych chtěla poděkovat své rodině za velkou podporu v průběhu studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá novými trendy v kultivaci kmenových buněk se zaměřením na indukované pluripotentní kmenové buňky a jejich využití v biomedicíně výzkumu. Práce se věnuje nejnovějším kultivačním technikám, jako je využití bioreaktorů, nanotechnologií a inovativních materiálů. Dále popisuje význam automatizace, robotizace a umělé inteligence při optimalizaci kultivačních procesů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kmenové buňky, indukované pluripotentní kmenové buňky, organoidy, bioreaktory, scaffoldy, nanotechnologie, automatizace.

TITLE

New trends in stem cell cultures

ANNOTATION

This bachelor's thesis deals with new trends in stem cell culture, focusing on induced pluripotent stem cells and their use in biomedical research. It presents the latest cultivation techniques, such as the use of bioreactors, nanotechnologies and innovative materials. It also describes the importance of automation, robotics and artificial intelligence in optimizing cultivation processes.

KEYWORDS

Stem cells, induced pluripotent stem cells, organoids, bioreactors, scaffolds, nanotechnology, automation.

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	14
1 Nové trendy v kultivaci kmenových buněk	15
1.1 Pokročilé kultivační techniky	15
1.1.1 Organoidy a jejich využití	15
1.1.2 Bioreaktory a dynamické kultivační systémy	19
1.2 Inovativní materiály a povrchy	21
1.2.1 Biomimetické materiály	21
1.2.2 Nanotechnologie v kultivaci buněk	23
1.3 Genetické a molekulární přístupy	25
1.3.1 CRISPR a genetické editace	25
1.3.2 Epigenetické modifikace	27
2 Automatizace a digitalizace	28
2.1 Automatizované kultivační systémy	28
2.1.1 Robotizace v laboratořích	28
2.1.2 Využití umělé inteligence a strojového učení	30
2.2 Digitální monitorování a analýza	33
2.2.1 Senzory a monitorování v reálném čase	33
2.2.2 Velká data a jejich analýza	34
3 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs)	36
3.1 Definice a charakteristika iPSCs	36
3.2 Historie objevu a vývoj technologií	36
3.3 Metody reprogramování somatických buněk na iPSCs	36
3.3.1 Genetické metody	36
3.3.2 Chemické metody	37
3.3.3 Epigenetické modifikace	38
3.3.4 Postup přípravy iPSCs	39
4 Postupy přípravy organoidů z iPS buněk	40
4.1 Specifické postupy pro různé typy organoidů	40

4.1.1	Mozkové organoidy	41
4.1.2	Střevní organoidy.....	41
4.1.3	Žaludeční organoidy	42
5	Využití iPS buněk v biomedicinském výzkumu.....	43
5.1	Regenerativní medicína	43
5.2	Modelování nemocí	46
5.3	Testování léčiv	48
	ZÁVĚR	50
	POUŽITÁ LITERATURA	51

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Schéma znázorňující využití mozkových organoidů	18
Obrázek 2: Příčné řezy FESEM snímků zobrazující depozici krystalů HA na povrchu vzorků kolagen/MBG_Sr4 % po 3 a 7 dnech inkubace v SBF	22
Obrázek 3: Schéma robotické stanice pro manipulaci s kapalinami	29
Obrázek 4: Příklady probíhajících klinických studií využívajících iPSCs	44

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2D	dvojměrný (two-dimensional)
3D	trojměrný (three-dimensional)
PSCs	pluripotentní kmenové buňky (pluripotent stem cells)
ESCs	embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells)
iPSCs	indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells)
aSCs	adultní kmenové buňky (adult stem cells)
ECM	extracelulární matrix (extracellular matrix)
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
BMP	kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)
RA	kyselina retinová (retinoic acid)
hiPSC	lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (human induced pluripotent stem cells)
NPCs	neurální progenitorové buňky (neural progenitor cells)
PIC	polyisocyanopeptidový hydrogel (polyisocyanopeptoid hydrogel)
PEG	polyethylenglykolový hydrogel (polyethylene glycol hydrogel)
PVA	polyvinylalkoholový hydrogel (polyvinyl alcohol hydrogel)
hHSPC	lidské hematopoetické kmenové progenitorové buňky (human hematopoietic stem and progenitor cells)
PAAm	polyakrylamidový hydrogel (polyacrylamide hydrogel)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
STBRs	bioreaktory s mechanickým mícháním (stirred-tank bioreactors)
SUBs	jednorázové bioreaktory (single-use bioreactors)
hPSC	lidské pluripotentní kmenové buňky (human pluripotent stem cells)
ROS	reaktivní forma kyslíku (reactive oxygen species)
MBGs	mesoporézní bioaktivní skla (mesoporous bioactive glasses)
SBF	simulovaná tělní tekutina (simulated body fluid)
HA	hydroxyapatit (hydroxyapatite)
QDs	kvantové tečky (quantum dots)

CRISPR	(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
Cas9	(CRISPR associated protein 9)
TALENs	(transcription activator-like effector nucleases)
ZFNs	(zinc finger nucleases)
sgRNA	vodící RNA (single guide RNA)
DSB	dvouvláknový zlom (double-strand break)
crRNA	CRISPR RNA
tracrRNA	trans-aktivující CRISPR RNA
PAM	(Protospacer Adjacent Motif)
NHEJ	nehomologní spojování konců (Non-Homologous End Joining)
HDR	homologně řízená oprava (Homology-Directed Repair)
hESCs	lidské embryonální kmenové buňky (human embryonic stem cells)
DNMTs	DNA methyltransferázy (DNA methyltransferases)
PLHW	programovatelné pracovní stanice pro manipulaci s kapalinami (programmable liquid handler workstation)
AI	umělá inteligence (artificial intelligence)
RPE	retinální pigmentové epiteliální (retinal pigment epithelial)
CNN	konvoluční neuronové sítě (convolutional neural networks)
XAI	vysvětlitelná umělá inteligence (explainable artificial intelligence)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
DO	rozpuštěný kyslík (dissolved oxygen)
CBI	buněčná impedanční spektroskopie (cell-based impedance spectroscopy)
GQDs	grafenové kvantové tečky (graphene quantum dots)
SERS	povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (surface-enhanced Raman spectroscopy)
scRNA-seq	sekvenování RNA jednotlivých buněk (single-cell RNA sequencing)
Oct4	(Octamer-binding transcription factor 4)
Sox2	(SRV-box transcription factor 2)
Klf4	(Krüppel-like factor 4)
c-Myc	(cellular Myelocytomatosis oncogene)
OSKM	Oct4, Sox2, Klf4 a c-Myc
AAV	adeno-asociovaný virus (adeno-associated virus)

SeV	Sendai virus
EBV	Epstein-Barr virus
HDAC	histonová deacetyláza (histone deacetylase)
VPA	kyselina valproová (valproic acid)
PBMCs	mononukleární buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)
ROCK	Rho-asociovaná kináza (Rho-associated protein kinase)
EBs	embryoidní tělesa (embryoid bodies)
DE	definitivní endoderm (definitive endoderm)
SOX17	(SRY-box transcription factor 17)
FOXA2	(forkhead box protein A2)
CDX2	(caudal type homeobox 2)
FGF4	fibroblastový růstový faktor 4 (fibroblast growth factor 4)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
FGF10	fibroblastový růstový faktor 10 (fibroblast growth factor 10)
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace (age-related macular degeneration)
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
SAD	sporadická Alzheimerova choroba (sporadic Alzheimer's disease)
FAD	familiární Alzheimerova choroba (familial Alzheimer's disease)
APP	amyloidový prekurzorový protein (amyloid precursor protein)
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2
APOE	apolipoprotein E
A β 42	amyloid-beta 42
NFTs	neurofibrilární klubka (neurofibrillary tangles)
DS	Downův syndrom (Down syndrome)

ÚVOD

Kmenové buňky představují díky své schopnosti sebeobnovy a diferenciaci do různých typů buněk vysoký potenciál v biomedicíně. Pro maximální využití jejich potenciálu je nezbytné překonat limity tradičních kultivačních metod. Běžné 2D povrchy neumožňovaly věrně napodobit přirozené mikroprostředí, což způsobovalo omezení jejich klinického využití. Výzkum se tak posunul k tvorbě 3D struktur, jako jsou organoidy, které lépe napodobují *in vivo* mikroprostředí a umožňují interakce mezi buňkami a extracelulární matrix.

Moderní kultivační přístupy se zaměřují na optimalizaci 3D kultivačních systémů, využití biomimetických materiálů, nanotechnologií a pokročilých genetických úprav, jako je CRISPR/Cas9. V oblasti kultivace kmenových buněk se stále více využívá robotizace a umělá inteligence, které zvyšují efektivitu, reprodukovatelnost a rychlost kultivačních procesů, zároveň snižují riziko lidské chyby oproti manuálním postupům.

Tato práce se zaměřuje především na indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs), které lze získat reprogramováním somatických buněk pacienta. iPSCs představují významný pokrok v personalizované medicíně, protože minimalizují riziko imunitního odmítnutí a zároveň nejsou spojeny s etickými překážkami.

1 Nové trendy v kultivaci kmenových buněk

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky, které mají schopnost diferencovat do různých typů specializovaných buněk, které slouží jako stavební kameny tkání a orgánů, a jsou tak velkým přínosem pro moderní medicínu. Díky své schopnosti sebeobnovy a diferenciaci nabízí široké využití v oblasti regenerativní medicíny a testování farmaceutických přípravků. [1] V současnosti zahrnují nové trendy v kultivaci kmenových buněk pokročilé kultivační techniky, kam spadají 3D modely, využití bioreaktorů a dynamických kultivačních systémů.

1.1 Pokročilé kultivační techniky

Vývoj nových kultivačních metod je klíčový pro efektivní práci s kmenovými buňkami. Běžná dvojrozměrná (2D) kultivace využívající ploché povrchy (Petriho misky) je doplněna o vývoj trojrozměrných (3D) kultivačních technologií, kdy jejich rozšířené využívání poskytuje významné příležitosti pro vylepšení *in vitro* modelů [2]. Tyto metody poskytují chemické a fyzikální podněty, které se více podobají *in vivo* mikroprostředí [3]. Trojrozměrné kultivační systémy také napodobují interakce mezi buňkami a extracelulární matrix [2]. Společně s napodobením mikroprostředí, ve kterém se buňky běžně vyskytují umožňují také nutriční podporu buněk a vznikajících tkáňových struktur. Tato podpora zajišťuje delší životaschopnost buněk, dostatek času pro diferenciaci a vývoj komplexních, funkčních tkáňových struktur [3].

1.1.1 Organoidy a jejich využití

Jednou z nejvýznamnějších aplikací 3D kultivačních technik jsou organoidy. Jedná se o trojrozměrné struktury vzniklé z kmenových buněk, které napodobují strukturální i funkční charakteristiky orgánů. [4]. Skládají se z orgánově specifických buněčných typů, které se samy organizují tříděním buněk. Mohou vznikat ze dvou hlavních typů kmenových buněk, tedy pluripotentních kmenových buněk (PSCs), které zahrnují embryonální kmenové buňky (ESCs) a indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs). Druhým typem jsou orgánově specifické adultní kmenové buňky (aSCs). Oba typy využívají zdánlivě neomezený expanzní potenciál normálních kmenových buněk při kultivaci v laboratorních podmínkách [5].

Významným přínosem pro tvorbu organoidů byl vývoj růstových faktorů, které zajišťují optimální podmínky pro jejich růst a diferenciaci tak, že napodobují přirozené mikroprostředí různých orgánových kmenových buněk. Pluripotentní kmenové buňky jsou

charakteristické neomezeným expanzním potenciálem, který hraje důležitou roli při kultivaci organoidů. Orgánově specifické adultní kmenové buňky byly naopak dlouho považovány za neschopné významné proliferace mimo tělo. To se však změnilo s využitím směsí růstových faktorů, které umožnily jejich širší laboratorní využití, napodobením jejich přirozeného mikroprostředí [5].

V poslední době došlo k významnému pokroku v oblasti kultivace organoidů s využitím chemicky a mechanicky definovaných hydrogelů. Jedná se o hydrofilní, zesíťované polymery, které mohou být navrženy tak, aby napodobovali vlastnosti extracelulární matrix (ECM) různých tkání. To umožňuje vytvořit velmi podobné *in vivo* mikroprostředí pro daný orgán, což podporuje růst a diferenciaci buněk v organoidu. Změnou fyzikálních, chemických nebo mechanických vlastností mohou být definované hydrogely přizpůsobeny tak, aby bylo možné vytvářet organoidní modely pro různé orgány. Pro zajištění přesné kontroly nad mikroprostředím organoidu se mohou do matrice hydrogelu přidávat růstové faktory, signální molekuly a další bioaktivní látky [6]. Například nervový růstový faktor (NGF) je nezbytný pro expresi neuronových genů a hraje důležitou roli při udržování funkce zralých neuronů v mozkových organoidech. Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) indukuje angiogenezi a tvorbu cévní sítě v cévních organoidech. Epidermální růstový faktor (EGF) stimuluje proliferaci epitelových buněk v orgánech, jako jsou střeva nebo plíce. Kostní morfogenetický protein (BMP) je klíčový růstový faktor, který reguluje osteogenní diferenciaci a přispívá k regeneraci kostní tkáně v kostních organoidech [7].

Mezi důležité signální molekuly patří například kyselina retinová (RA), která aktivuje specifické signální dráhy, jako je Wnt, ovlivňující diferenciaci buněk [8]. Dalším příkladem signální dráhy je dráha Notch. Aktivace této dráhy podporuje správný vývoj organoidů, především v epiteliálních orgánech, tak, že udržuje rovnováhu mezi proliferací a diferenciací buněk, což je nezbytné pro tvorbu funkčních tkání. Tyto přídavky růstových faktorů a signálních molekul umožňují úpravu podmínek pro zlepšení růstu organoidů a podporu vývoje, aby přesněji napodobovaly chování a funkce daného orgánu [9].

V posledních letech umožnil vznik několika přírodních a syntetických hydrogelů s přesně vyladěnými biochemickými a biofyzikálními vlastnostmi významné přínosy v oblasti biomedicíny organoidů, což přispívá k vylepšení kultivačních podmínek a vyšší využití v regenerativní medicíně a dalších oblastech. Mezi příklady přírodních hydrogelů patří například kolagen získaný z pojivové tkáně zvířat, který se využívá pro kultivaci střevních

epiteliálních organoidů nebo organoidů lidských mléčných žláz [6]. Kolagen je jedním z hlavních strukturálních prvků ECM a hraje klíčovou roli v regulaci buněčné adheze, chemotaxe, migrace a vývoje tkání. Díky těmto vlastnostem mohou kolagenové hydrogely napodobovat vnitřní prostředí organismu a podporovat růst a diferenciaci buněk [10]. Jeho nevýhodou je však nízká mechanická pevnost a špatná tepelná stabilita [6]. Dalším významným přírodním hydrogelem je kyselina hyaluronová (HA), která je také hlavním strukturálním ECM a nachází se ve tkáních, jako je kůže a chrupavka. HA usnadňuje buněčné přežití, migraci, angiogenezi, diferenciaci a regeneraci nervové tkáně prostřednictvím transdukce intracelulárních signálů [10]. Studie ukazují, že HA hydrogelové nosiče mohou podporovat neurální diferenciaci lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (hiPSC-NPCs) nebo zlepšit kvalitu buněk a podpořit efektivní kardiální diferenciaci hiPSC při 3D kultivaci [11].

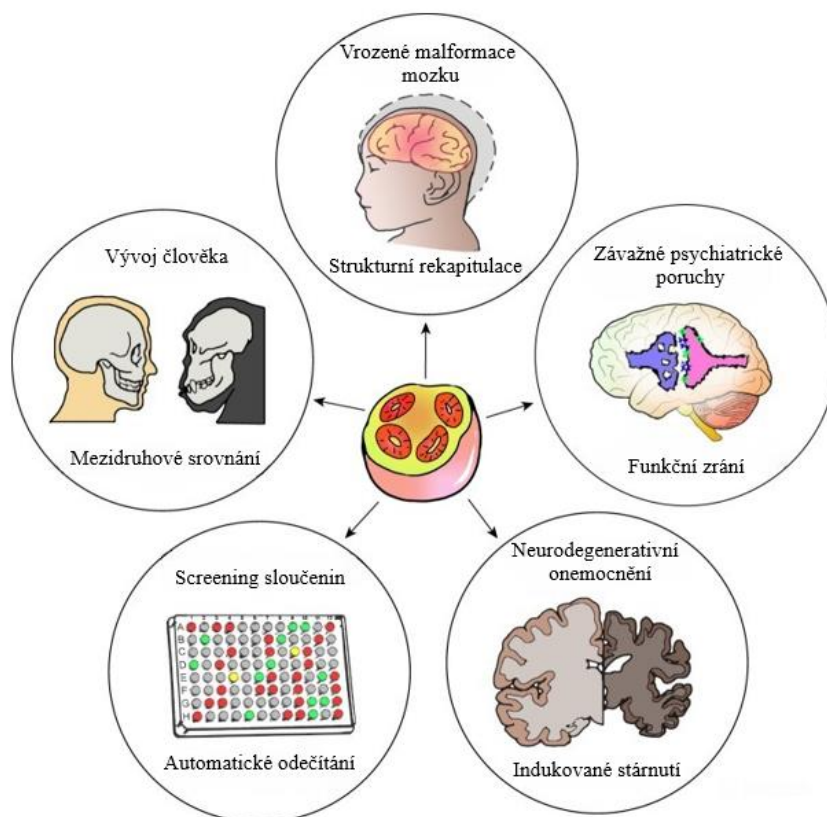
Dalšími příklady přírodních hydrogelů jsou celulóza, chitosan, alginát, agaróza, želatina a fibrin. Mezi nevýhody přírodních hydrogelů patří jejich rychlá degradace, nízká stabilita a mechanická pevnost. Přestože jsou přírodní hydrogely bezpečné pro většinu populace, některé materiály přírodních hydrogelů mohou ve vzácných případech vyvolat alergické reakce. To znamená, že při použití u citlivých jedinců mohou představovat potenciální imunologické riziko [10].

Mezi syntetické hydrogely patří například polyisocyanopeptidový hydrogel (PIC), který se využívá pro kultivaci organoidů jater nebo mléčných žláz [6]. Dalšími často využívanými syntetickými hydrogely jsou polyethylenglykolový (PEG) a polyvinylalkoholový (PVA) hydrogel, které jsou široce využívány pro 3D nosné struktury díky své biokompatibilitě, absenci imunitní reakce a nastavitelné tuhosti [10]. PEG hydrogely se vyznačují biokompatibilitou, dobrou rozpustností ve vodě a možností snadné modifikace. Vykazují však nízkou adhezi k buňkám a jsou nedostatečně bioaktivní. Využívají se například pro tvorbu organoidů kostní dřeně odvozených od lidských hematopoetických kmenových progenitorových buněk (hHSPC), primárních lidských intestinálních enterocytů, endometriálních organoidů a organoidů jater odvozených z iPSCs. PVA hydrogely jsou hydrofilní, mají dobrou mechanickou pevnost a nízkou toxicitu a využívají se pro kultivaci pankreatických organoidů. Dalším syntetickým hydrogelem je polyakrylamid (PAAm). Tento biokompatibilní polymer vykazuje dobré hydrofilní vlastnosti, má schopnost bobtnat a využívá se například při vývoji kardiovaskulárních organoidů [6].

Mechanické vlastnosti hydrogelů, jako je tuhost a elasticita, mají zásadní vliv na chování kmenových buněk. Například vyšší tuhost hydrogelů podporuje diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk směrem k osteogenní linii, zatímco měkčí hydrogely podporují neurogenní diferenciaci. Tyto vlastnosti umožňují přesnou kontrolu diferenciaci kmenových buněk a vytváření nových typů tkání [10].

Oproti tradičním přístupům poskytují organoidní aplikace nové možnosti. Mezi klinické aplikace patří například modelování nemocí, experimenty spojené s vývojem orgánů, regenerativní a transplantační medicína, personalizovaná medicína nebo vývoj konvenčních i nano-léků. Organoidy simulují fyziologické vlastnosti orgánových systémů, umožňují obnovovat strukturu a funkci orgánů, což hraje důležitou roli právě v regenerativní medicíně [12].

Jedním z příkladů využití organoidů jsou mozkové organoidy, které jsou zkoumány z hlediska potenciálu pro modelování neurologických onemocnění. Výzkum prokázal schopnost organoidů napodobit fenotypy neurologických nemocí, kdy byly strukturní malformace patrné již v časných embryonálních stádiích [13].



Obrázek 1: Schéma znázorňující využití mozkových organoidů. Převzato a upraveno z Guo-li Ming, Hongjun Song, Xuyu Qian, 2019.

Mechanismy těchto poruch často souvisí s narušenou regulací progenitorových buněk, předčasnou diferenciací, sníženou proliferací a narušením buněčného cyklu. Mozkové organoidy zajišťují spolehlivý výzkum a analýzu těchto faktorů a jsou tedy významným přínosem při pochopení a léčbě neurologických onemocnění. Mezi další aplikace mozkových organoidů patří například modelování vrozených mozkových malformací způsobených genetickým deficitem nebo infekčním onemocněním, případně modelování psychiatrických poruch, jako je autismus a schizofrenie [14].

1.1.2 Bioreaktory a dynamické kultivační systémy

Díky schopnosti kmenových buněk sebeobnovy a diferenciaci do různých typů specializovaných buněk jsou kmenové buňky velmi přínosné pro terapeutické aplikace. Avšak počet buněk potřebných pro léčbu často převyšoval kapacitu dostupných dárců. Pokrok v tomto odvětví tedy závisel na vývoji technologie, která umožní efektivní, systematickou a nákladově přijatelnou produkci kmenových buněk ve velkém množství. Bioreaktory představují klíčový nástroj pro dosažení těchto cílů. Bioreaktory splňují nejen tyto podmínky, ale také dodržují přísné regulační předpisy a směrnice FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) a EMA (Evropská léková agentura) [15]. Tyto směrnice zajišťují bezpečnost a kvalitu výsledných produktů biologických léčiv, buněčných terapií a produktů odvozených od kmenových buněk [16].

V bioreaktoru jsou buňky kultivovány v prostředí, které simuluje in vivo podmínky, což je potřebné pro jejich růst a diferenciaci. Buňky se zavádějí do nádoby bioreaktoru, kde probíhá přísná kontrola klíčových parametrů, jako je teplota, pH, hladina kyslíku a koncentrace živin, pro usnadnění růstu v čase [17]. Výhoda bioreaktoru je taková, že zajišťuje škálovatelnost procesu, což umožňuje vyšší výtěžky buněk [18].

Existuje několik typů bioreaktorů, které se liší v závislosti na jejich principu míchání, dávkování živin a dalších faktorech. Mezi nejznámější patří například bioreaktory s mechanickým mícháním (STBRs, stirred-tank bioreactors) a jednorázové bioreaktory (SUBs, single-use bioreactors) [19] [20]. Dynamické kultivační systémy, jako jsou bioreaktory s mechanickým mícháním, perfuzní bioreaktory nebo orbitální třepací platformy mají zásadní vliv na chování buněk během kultivace. Konkrétní podmínky, jako je proudění tekutin umožňují vytvářet agregáty bez nekrotických jader, je také možné pozorovat zvýšenou proliferaci, viabilitu a diferenciací potenciál buněk. Tyto systémy podporují rovnoměrné

rozložení živin a kyslíku, čímž dochází k eliminaci agregátů, které by mohly vést k tvorbě nekrotických jader [21].

Bioreaktory s mechanickým mícháním se široce využívají v biofarmaceutickém průmyslu pro výrobu rekombinantních proteinů ze savčích buněčných linií, jako jsou ovariální buňky čínského křečka [22]. V poslední době bylo však dosaženo významného pokroku ve využití těchto bioreaktorů v kultivaci kmenových buněk [19].

STBRs se obvykle skládají ze stálé skleněné nebo jednorázové plastové nádoby s vnitřním míchadlem. Kromě efektivního míchání umožňuje míchadlo získat potřebný vzestupný proud proti gravitaci, čímž udržuje buňky a buněčné agregáty v suspenzi [22]. Míchání je důležité pro správnou distribuci živin a udržení potenciálních mikronosičů v suspenzi. Využití mikronosičů zvyšuje expanzi buněk tak, že zvětšuje kultivační povrch, což umožňuje vyšší produkci buněk [23]. STBRs také umožňují neinvazivní odběr vzorků buněk a média s využitím portů integrovaných do systému, bez přerušení procesu [22]. Tyto bioreaktory poskytují základ pro zavedení účinných režimů expanze lidských pluripotentních kmenových buněk (hPSC). Pokud je proces správně navržen, produkované kmenové buňky zůstávají pluripotentní a chromozomálně stabilní [19].

Bioreaktory s mechanickým mícháním také umožňují spolehlivou kontrolu důležitých parametrů, jako jsou koncentrace substrátů a metabolitů (např. glukózy, glutaminu, laktátu a amoniaku), a také obsahu rozpuštěného kyslíku. Napětí rozpuštěného kyslíku může ovlivnit expanzi a diferenciaci kmenových buněk, proto je nutné jej monitorovat [19]. Analýza metabolitů, jako jsou koncentrace glukózy, laktátu a amoniaku se provádí externími analyzátory [22]. Bioreaktory mohou být také vybaveny senzory, které umožňují přesné hodnocení kultivačního prostředí, včetně pH, teploty a koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS) [19]. Nadprodukce ROS může vést k oxidačnímu stresu, který může negativně ovlivnit růst a diferenciaci buněk. ROS může také zprostředkovat expresi prozánětlivých genů pomocí extracelulárních signálních drah a způsobit chronické záněty, které významným způsobem ovlivňují diferenciaci a regeneraci kmenových buněk [24]. Glukóza a glutamin slouží jako hlavní zdroje energie, naopak laktát a amoniak mohou inhibovat expanzi kmenových buněk. Teplota se obvykle udržuje na 37 °C. Přidávají se také růstové faktory, které napomáhají široké škále funkcí kmenových buněk, včetně sebeobnovy a diferenciaci. Koncentrace těchto faktorů by se měla pohybovat v rozmezí zajišťujícím optimální podmínky pro expanzi buněk.

Díky schopnosti bioreaktorů přesně regulovat parametry, jako jsou koncentrace substrátů, metabolitů, kyslíku a ROS, umožňuje ochranu buněk před negativními vlivy, jako je oxidační stres a podporuje optimální růst a diferenciaci kmenových buněk v průběhu kultivace [19]. Flexibilní a automatizované řízení provozních režimů bioreaktoru přináší nové možnosti pro zlepšení a zjednodušení procesu kultivace kmenových buněk [22].

1.2 Inovativní materiály a povrchy

Inovativní materiály jsou zásadní pro kultivaci kmenových buněk, protože mají vliv na jejich diferenciaci, proliferaci a celkovou životaschopnost. Mezi moderní postupy patří využití biomimetických materiálů, které napodobují přirozené vnitřní mikroprostředí a nanotechnologií, které umožňují přesnou regulaci kultivačních podmínek [25]. V posledních dvou desetiletích se biomimetická strategie, založená na nových materiálech, postupně stala nejrychleji se rozvíjejícím a nejslibnějším oborem v oblasti biomateriálů [26].

1.2.1 Biomimetické materiály

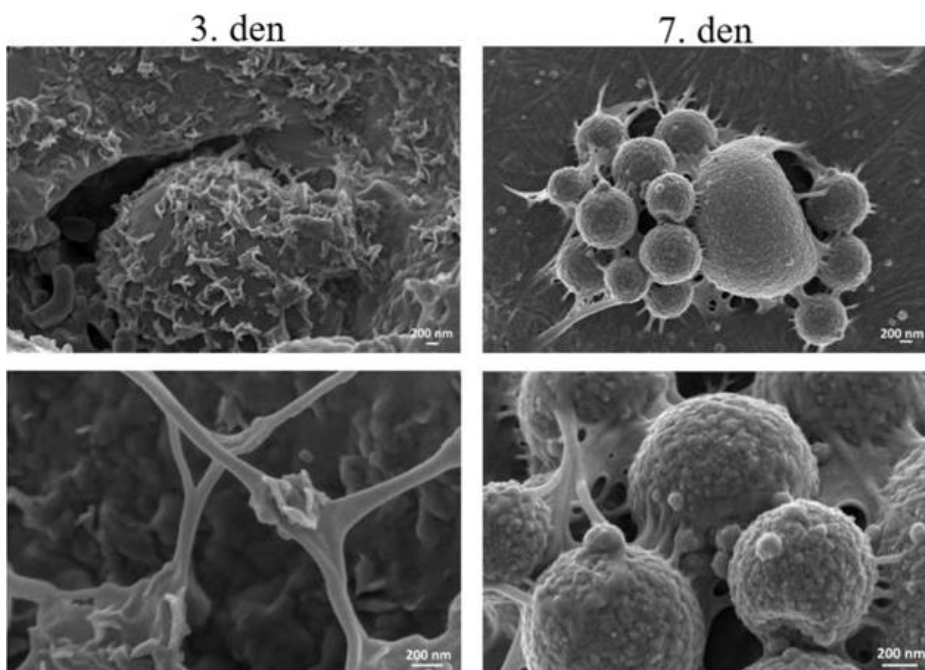
Biomimetické materiály jsou pokročilé biomateriály, které věrně napodobují strukturální, mechanické a biologické vlastnosti přirozených tkání v nanoměřítku [27]. Schopností napodobení a simulací biologických fenoménů získávají umělé nanostruktury, jako jsou dendritické struktury, proteinové nanoklece (duté nanostruktury) a lidské proteinové nanočástice, podobné nebo identické vlastnosti s jejich přirozenými protějšky. Tyto materiály jsou také inspirací k vývoji systémů pro cílené dodávání léčiv, čímž poskytují vyšší účinnost a bezpečnost terapie [26].

Biomimetické a bioaktivní materiály slouží také jako slibné systémy schopné cíleně řídit a modulovat chování buněk prostřednictvím specifických instrukčních signálů, čímž mohou přispět k regeneraci zdravých tkání. Tyto typy materiálů se často využívají k navrhování nosných struktur tzv. „scaffoldů“, jejichž cílem je napodobit strukturální, mechanické a biologické vlastnosti přirozených tkání, a to s ohledem na komplexní organizaci extracelulárního mikroprostředí v nanoměřítku [27].

Příkladem biomimetického materiálu je kolagen typu I, což je nejhojnější strukturální protein lidského těla a tvoří až 90 % organické složky přirozené kostní tkáně. Navíc tento strukturální protein ovlivňuje různé aspekty chování kmenových buněk, jako je buněčná adheze, proliferace a diferenciaci díky vysoké hustotě Arg-Gly-Asp a dalších funkčních sekvencí aminokyselin. Tyto vlastnosti činí kolagen klíčovou komponentou biomimetických scaffoldů pro kostní inženýrství [28]. Avšak jeho nízká biomechanická pevnost a rychlá

biodegradace vyžadují stabilizaci. Toho lze dosáhnout například metodami chemického zesíťování nebo přidavkem anorganických fází, jako jsou fosforečnany vápenaté nebo bioaktivní skla. Za slibný přístup je považována kombinace kolagenu I. typu s mesoporézními bioaktivními skly (MBGs, mesoporous bioactive glasses), která díky jejich vysokému povrchu a reaktivitě výrazně zlepšují bioaktivitu, čímž podporují mineralizaci, osteogenezi a interakci s okolní kostní tkání. Do složení skla mohou být přidány ionty stroncia (Sr^{2+}), které prokazatelně zvyšují osteogenní vlastnosti tak, že stimulují aktivitu osteoblastů a tím zvyšují tvorbu kosti a zároveň snižují kostní resorpci [27].

Příklad účinné kombinace kolagenu s MBGs obsahujícími stroncium je znázorněn na obrázku 2. Ten zobrazuje příčné řezy povrchu vzorků kolagen/MBG_Sr4% po 3 a 7 dnech inkubace při 37 °C v simulované tělní tekutině (SBF), pořízené pomocí FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy). Je patrné, že již po 3 dnech inkubace v SBF je možné pozorovat progresivní tvorbu krystalů hydroxyapatitu (HA), zatímco mezi 3. a 7. dnem inkubace došlo k nárůstu hustoty a velikosti těchto krystalů. HA je klíčová minerální složka kosti, jeho nárůst již po 3 dnech inkubace tedy vypovídá o vysoké bioaktivitě tohoto systému, která umožňuje interakci s fyziologickým prostředím a iniciaci mineralizačního procesu [27].



Obrázek 2: Příčné řezy FESEM snímků zobrazující depozici krystalů HA na povrchu vzorků kolagen/MBG_Sr4 % po 3 a 7 dnech inkubace v SBF. Převzato a upraveno z Montalbano G. a kol., 2018.

Biomimetické materiály představují významný pokrok v oblasti tkáňového inženýrství, díky své schopnosti napodobit strukturu i biologickou funkci přirozených tkání. Nové trendy v této oblasti se zaměřují na konstrukci scaffoldů s hierarchickou strukturou, která přesně napodobuje uspořádání přirozených tkání v nano- i mikroměřítku. Důležitou roli hrají víceprvkové materiály, které využívají ionty s různými biologickými účinky. Příkladem jsou prokázané synergické účinky iontů kobaltu (Co^{2+}) a hořčíku (Mg^{2+}) společně s HA, které zlepšují osteogenezi, angiogenezi a obecně bioaktivitu systému. Je však potřeba přesně kontrolovat koncentrace jednotlivých iontů, aby nedošlo k toxickým účinkům [29].

Biomimetické materiály vedle regenerace tkání a konstrukce scaffoldů umožňují také tvorbu umělých buněčných struktur. Bottom-up strategie je přístup, při kterém dochází k rozkladu složitých biologických struktur na jednodušší komponenty, za účelem hlubšího pochopení principů živých systémů. Tyto umělé struktury otevírají nové možnosti pro aplikace v biomedicíně, bioinženýrství a environmentálních vědách [26].

1.2.2 Nanotechnologie v kultivaci buněk

Od roku 2020 se výzkum v oblasti kmenových buněk posunul k řešení technologických překážek, prohlubováním znalostí a zkoumáním nových terapeutických využití. V této souvislosti se stále více uplatňují nanotechnologie, které umožňují přesnější studium těchto buněk, ale otevírají i nové možnosti pro jejich využití v regenerativní medicíně [30]. Nanomateriály se využívají ke konstrukci scaffoldů v tkáňovém inženýrství, jako nosiče pro cílené dodávání léků, pro zobrazování buněk a monitorování jejich diferenciaci a proliferaci. Příkladem těchto nanomateriálů jsou nanočástice zlata, stříbra, oxid titaničitý, různé magnetické materiály, uhlíkové nanotrubičky, grafen a polymerní materiály [31].

Nanotechnologie pracují s rozměry v rozmezí od 1 do 100 nm. Tento rozsah velikostí je důležitý, protože vyplňuje mezeru mezi atomárními nebo molekulárními strukturami a makroskopickými složkami [31]. Materiály v nanoměřítku často vykazují odlišné vlastnosti, které se výrazně liší od jejich makroskopických protějšků. To je způsobeno především jejich výrazně větším poměrem povrchu k objemu a současným vlivem kvantových jevů. Mezi tyto vlastnosti patří například zvýšená chemická reaktivita, specifická elektrická vodivost, mechanická pevnost a odlišné optické chování [32].

Právě tyto vlastnosti umožňují detailnější studium a manipulaci s kmenovými buňkami. Například optické vlastnosti některých nanomateriálů, jako jsou kvantové tečky (QDs), umožňují detailní sledování a zobrazování chování buněk přímo během kultivace [33].

QDs jsou velké 2-10 nm a vykazují výjimečnou fluorescenci. Intenzita a stabilita této fluorescence je až 1000× vyšší v porovnání s běžnými fluorescenčními materiály. Díky těmto vlastnostem jsou kvantové tečky ideálním nástrojem pro dlouhodobé a velmi citlivé sledování kmenových buněk během kultivace. V poslední době se věnuje pozornost uhlíkovým kvantovým tečkám, které by mohly sloužit jako méně toxická varianta pro zobrazování buněk. [34].

Využití nanomateriálů může také zvyšovat životaschopnost a stabilitu buněk v kultivačním prostředí. Propojení nanotechnologií s výzkumem zabývajícím se kmenovými buňkami tak poskytuje nové možnosti pro přesnější a snazší řízení procesů, jako je diferenciací kmenových buněk, což přispívá ke zlepšení léčebných postupů. Nanomateriály také zlepšují cílený transport kmenových buněk do specifických oblastí tkání nebo orgánů, kde zajišťují jejich kontrolované uvolňování [33].

Při kultivaci kmenových buněk s využitím nanomateriálů hraje významnou roli funkcionalizace jejich povrchu. Jde o cílenou úpravu povrchu nanočástic, za účelem zlepšení jejich interakce s molekulami na povrchu kmenových buněk. Proces funkcionalizace probíhá tak, že se na povrch nanočástic naváží chemické skupiny nebo bioaktivní látky, které umožňují vytvořit specifické vazby na kmenové buňky. Tím dochází ke vzniku bioaktivního rozhraní, které umožňuje přesněji zacílit a ovlivnit buněčnou signalizaci. Takto upravené nanočástice podporují diferenciaci, proliferaci i migraci kmenových buněk tak, že přesněji a efektivněji dodávají signály a terapeutické látky [33].

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím vlastnosti a chování kmenových buněk během kultivace a jejich následné využití je tvar nanomateriálů. Například planární nanočástice mohou napodobovat interakce ECM, čímž podporují diferenciaci a proliferaci kmenových buněk. Sférické nanočástice, díky svému velkému poměru povrchové plochy k objemu, zlepšují buněčnou absorpci a zajišťují tak účinný transport terapeutické látky do kmenových buněk. Naopak vláknité a trubičkovité nanočástice mohou díky svému protáhlému tvaru řídit buněčnou orientaci a diferenciaci, což je nezbytné pro aplikace v tkáňovém inženýrství [35].

Zásadní roli pro správnou funkci kmenových buněk má jejich přirozené mikroprostředí neboli niche. To podporuje sebeobnovu, diferenciaci a proliferaci buněk a zároveň poskytuje specifické signály, které řídí jejich chování [36]. Nanotechnologie umožňují vytvářet scaffoldy, což jsou komplexní nosné struktury, jejichž cílem je napodobit

právě toto mikroprostředí [33]. Klíčovou složkou niche je ECM, kterou je důležité při konstrukci scaffoldů co nejdříve napodobit. Bylo totiž prokázáno, že kmenové buňky jsou velmi citlivé na její prvky, které zahrnují fibrilární kolageny elastin a glykosaminoglykany v nanoměřítku [33] [36].

Kromě chemického složení ECM však hraje zásadní roli i její topografie a povrchová struktura. Proto se v současnosti využívají různé umělé nanotechnologické platformy, které napodobují topologické charakteristiky přirozeného mikroprostředí. Příkladem těchto topografických prvků jsou nanodrážky, nanopóry nebo nanovlákná, která zlepšují přilnavost, migraci a diferenciaci kmenových buněk [37]. Konstrukcí umělých scaffoldů, které věrně napodobují chemické i fyzikální vlastnosti ECM je tak možné efektivně regulovat chování buněk *in vitro*, podobně jako v jejich přirozeném mikroprostředí [33].

Významnou roli zde hrají nanokompozitní materiály, jejichž vlastnosti přispívají v řadě aplikací a výzkumu kmenových buněk. Využívají se především při konstrukci biokompatibilních scaffoldů, které napodobují složení i strukturu ECM, čímž zvyšují jejich mechanickou pevnost a stabilitu. Jejich nanostruktura velmi připomíná skutečné tkáňové prostředí, což podporuje buněčnou adhezi, diferenciaci a proliferaci [38].

Kombinace nanotechnologií s kmenovými buňkami významně rozšiřuje možnosti regenerativní medicíny. Tyto přístupy umožňují lépe řídit buněčné procesy, jako je diferenciace a proliferace, ale i vytvořit prostředí, které co nejdříve napodobuje jejich přirozené podmínky. Výzvou však stále zůstává optimalizace biokompatibility a dlouhodobé stability těchto systémů [33].

1.3 Genetické a molekulární přístupy

Genetické a molekulární přístupy poskytují nové nástroje pro studium, manipulaci a využití kmenových buněk v klinické praxi. Tyto metody umožňují přesné úpravy genomu pomocí pokročilých technik, jako je CRISPR/Cas9 nebo kontrolu epigenetických mechanismů, jako jsou metylace DNA a modifikace histonů [39].

1.3.1 CRISPR a genetické editace

Editace genomu kmenových buněk je důležitá, protože nám umožňuje lépe pochopit základní biologické procesy a zároveň otevírá nové možnosti pro vývoj buněčných terapií a léčbu genetických onemocnění. V posledních deseti letech došlo k rychlému rozvoji nástrojů pro editaci genomu, a to především díky objevu nových a snadno použitelných

technologií, kam patří především systém CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated protein 9) [39]. Ve srovnání s dřívějšími technologiemi nukleáz, jako jsou TALENs (transcription activator-like effector nucleases) nebo ZFNs (zinc finger nucleases), poskytuje CRISPR/Cas9 relativně jednoduché programování, vysokou účinnost a cenovou přijatelnost, protože ke změně cílového místa vyžaduje pouze úpravu sekvence vodící RNA (sgRNA, single guide RNA). Právě proto se CRISPR/Cas9 stala nejrozšířenější technologií genetické editace [41].

Systém CRISPR/Cas9 se skládá především z Cas9 nukleázy, která pracuje jako molekulární nůžky, a z sgRNA, která obsahuje sekvenci komplementární k cílovému úseku DNA v genomu. Tato sgRNA obsahuje sekvenci specifickou CRISPR RNA (crRNA) a pomocnou trans-aktivující crRNA (tracrRNA) [40]. Po navázání sgRNA na specifickou sekvenci v DNA dochází k aktivaci Cas9 nukleázy, která způsobí dvouvláknový zlom (DSB). Aby však došlo k úspěšnému navázání a štěpení DNA Cas9 proteinem, je nutná přítomnost PAM (Protospacer Adjacent Motif) sekvence za cílovým místem [41]. Vznikem DSB dojde k aktivaci buněčných opravných mechanismů. U lidských buněk jsou standardní 2 opravné dráhy, nehomologní spojování konců (NHEJ) a homologně řízená oprava (HDR) [39].

NHEJ dráha je rychlá a vyskytuje se ve všech fázích buněčného cyklu kromě mitózy. Cílem této dráhy je co nejrychleji znovu spojit přerušené konce DNA [39]. Během tohoto procesu však často vznikají chyby, což může vést ke vzniku malých inzercí nebo delecí (indel mutací), které mohou způsobit inaktivaci genu [41]. Naopak HDR dráha je přesnější, ale méně efektivní, protože vyžaduje přítomnost homologního templátu. HDR je aktivní pouze během určitých fází buněčného cyklu, především v S a G2 fázi, kdy je k dispozici sesterská chromatida, která zde slouží jako templát [39]. Díky schopnosti HDR využít templát umožňuje tato dráha přesnou a cílenou editaci genomu, zatímco NHEJ se využívá pro inaktivaci genu [40].

Právě tyto schopnosti NHEJ a HDR otvírají nové možnosti aplikací systému CRISPR/Cas9 ve výzkumu a terapii s využitím kmenových buněk. Například v medicíně se tato technologie testuje pro léčbu genetických onemocnění, jako je srpkovitá anémie nebo Duchennova svalová dystrofie, kde umožňuje přesnou korekci patogenních mutací [39]. Dalším přístupem je cílené vnesení specifických mutací do zdravých kmenových buněk za účelem vytvoření isogenních modelů lidských onemocnění *in vitro*. To umožňuje studovat

patogenezi chorob, jako jsou neurologické poruchy nebo různé typy rakoviny v geneticky kontrolovaném prostředí [40].

Výzvou při využívání systému CRISPR/Cas zůstává riziko tzv. off-target efektů. Tyto efekty spočívají v nespecifickém navázání a modifikaci genomu na nechtěných místech, která vykazují sekvenční podobnost s cílovou sekvencí [40]. Off-target efekty se nejčastěji vyskytují v místech, která obsahují PAM sekvenci a jsou částečně komplementární k sgRNA. S cílem redukovat off-target efekty vědci vynalezli několik vylepšených verzí systému, jako je tzv. *nickase* verze Cas9, řízená párovými vodíčovými RNA. Další pokrok oblasti CRISPR/Cas technologií směřoval k vývoji systémů pro úpravu genomu bez nutnosti tvorby DSB, což by mohlo výrazně snížit riziko off-target efektů [41].

1.3.2 Epigenetické modifikace

Epigenetické modifikace jsou dalším nástrojem pro udržení pluripotence, plasticity a funkce kmenových buněk *in vivo* i *in vitro*. Tyto modifikace umožňují kontrolovat genovou expresi beze změny sekvence DNA. To udržuje rovnováhu mezi proliferací, diferenciací a schopností regenerace kmenových buněk [42]. Mezi tyto mechanismy patří například methylace DNA a posttranslační modifikace histonů, které způsobují změny ve struktuře chromatinu. Právě změny v prostorovém uspořádání chromatinu určují, zda budou geny aktivní nebo potlačené [43].

Při methylaci DNA dochází k adici methylové skupiny na cytosiny CpG dinukleotidů (cytosin–guanin spojené fosfátovou skupinou). Tato reakce je katalyzována DNA methyltransferázami (DNMTs). Methylace hraje důležitou roli v ESCs, protože přímo ovlivňuje expresi genů spojených s pluripotencí, diferenciací a sebeobnovou. Bylo zjištěno, že hESCs vykazují specifický profil methylace DNA, který se liší od diferencovaných i nádorových buněk. Klíčové geny, jako jsou *Oct4* a *Nanog*, jsou v ESCs a iPSCs převážně v nemethylované formě, což umožňuje jejich expresi a udržení pluripotentního stavu. Naopak v diferencovaných buňkách jsou tyto geny často hypermethylované, což vede k utlumení jejich exprese. Regulace methylace DNA je proto klíčová při kontrole kmenových buněk během jejich diferenciace [44].

Vedle methylace DNA hrají v regulaci kmenových buněk zásadní roli také posttranslační modifikace histonů. U pluripotentních buněk je charakteristická přítomnost bivalentního chromatinu. Ten se vytváří na promotorech vývojových genů, kde se současně vyskytují aktivační (H3K4me3) a inhibiční (H3K27me3) histonové značky. Tyto geny jsou

transkripčně utlumeny, ale zároveň se nachází v připraveném stavu. To umožňuje jejich rychlou aktivaci nebo trvalé utlumení během diferenciací [43].

Využití epigenetických modifikací při kultivaci kmenových buněk přináší nové potenciální příležitosti pro vývoj nových přístupů v léčbě rakoviny, degenerativních onemocnění a dalších aplikací. V současnosti se testují tzv. „epi-léky“ jako potenciální léčba u různých typů rakoviny [42].

2 Automatizace a digitalizace

Rozvoj technologií pro kultivaci kmenových buněk a z nich vzniklých organoidů otevřel nové možnosti využití v regenerativní medicíně, modelování nemocí a testování léčiv [45]. Pro úspěšné využití těchto technologií v praxi však roste potřeba zajištění standardizovaných, reprodukovatelných a škálovatelných metod pro jejich kultivaci a analýzu [46]. Přestože jsou manuální postupy stále klíčové v základním výzkumu, narážejí na nedostatky v efektivitě, konzistenci a schopnosti zvládat velké objemy vzorků. Právě zde hraje automatizace a digitalizace důležitou roli, protože pomáhá překonat tyto překážky [47].

2.1 Automatizované kultivační systémy

Moderní automatizované kultivační systémy představují významný pokrok v oblasti standardizace a zvýšení efektivity při práci s kmenovými buňkami a organoidy. Využití těchto systémů pomáhá překonat nedostatky manuálních metod, které jsou často časově náročné, náchylné k lidským chybám a obtížně škálovatelné. Automatizované systémy umožňují přesnou kontrolu kultivačních podmínek, minimalizují variabilitu mezi jednotlivými šaržemi zároveň umožňují dlouhodobé kultivace s minimálním lidským zásahem [48] [49].

2.1.1 Robotizace v laboratořích

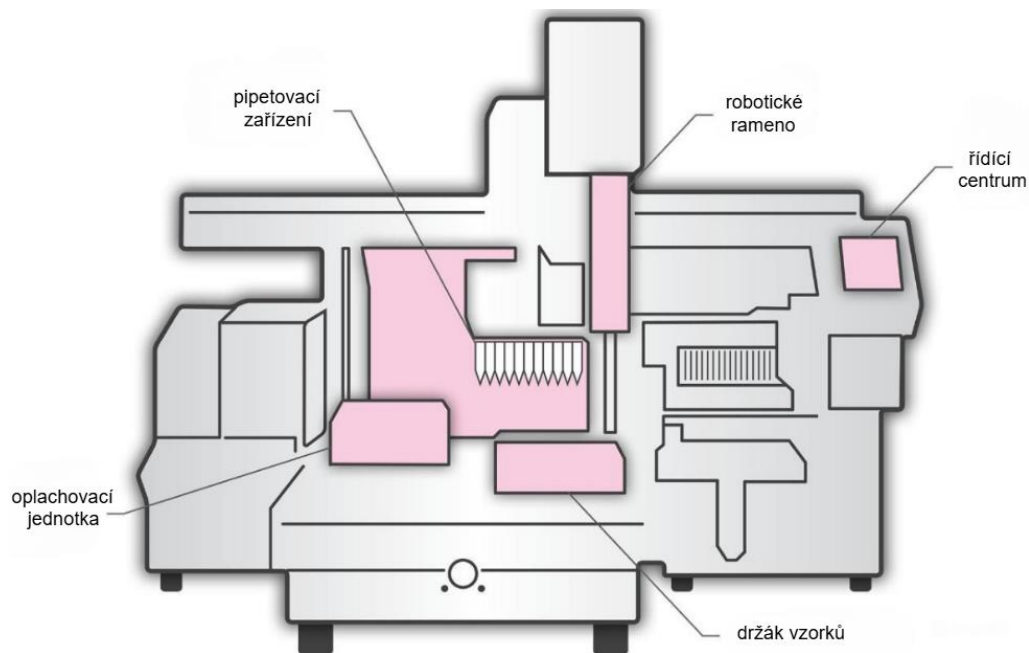
Robotizace představuje důležitý nástroj v oblasti automatizace laboratorních procesů. Umožňuje přenést řadu manuálních metod, které jsou často náchylné k chybám, časově náročné a málo efektivní, na specializované mechanické a programovatelné systémy [49].

Existuje několik typů robotických přístupů, patří sem například využití humanoidních robotů, jejichž vysoká flexibilita umožňuje přizpůsobení na časté změny protokolů a parametrů. Snaha těchto robotů je co nejvěrněji napodobit lidské pohyby a manipulace [47]. Dalším příkladem jsou rozsáhlé integrované platformy, které propojují více specializovaných modulů, jako jsou inkubátory, centrifugy nebo pipetovací stanice, pomocí centrálního robotického ramene. Tímto způsobem umožňují automatizaci

vícekových procesů od přípravy kultivačního prostředí až po vyhodnocení výsledků [50]. Jeden z nejrozšířenějších robotických systémů v buněčných laboratořích tvoří programovatelné pracovní stanice pro manipulaci s kapalinami (PLHW, programmable liquid handler workstation) [51].

PLHW představují nástroj, jehož základní funkcí je především automatizace pipetování, což zajišťuje vysokou přesnost a opakovatelnost, protože se eliminuje riziko lidské chyby. To je důležité především při práci s malými objemy nebo při provádění velkého počtu operací. Mezi další výhody patří plně automatizované ředění, přenos roztoků, dávkování reagensů a výměna kultivačních médií s vysokou přesností a reprodukovatelností [51]. Tento systém zahrnuje jednu nebo více pipetovacích hlav, které mohou být jednakanálové, pro práci s jednotlivými zkumavkami a jamkami, nebo vícekanálové, nejčastěji s 96 nebo 384 kanály. Vícekanálové hlavy umožňují současné zpracování celých destiček s vysokou přesností [50].

Například systém Beckman Coulter Biomek i7, který lze využít pro automatizovanou kultivaci chondrogenních buněčných agregátů, využívá dvě 96-kanálové pipetovací hlavy. Systém je vybaven CO₂ inkubátory a chladícím zařízením, což umožňuje dlouhodobé kultivace. Chondrogenní agregáty odvozené z iPS buněk vznikají 56denní kultivací, kdy systém vyžaduje pouze časově přesné dodání růstových faktorů a častou výměnu médií [51].



Obrázek 3: Schéma robotické stanice pro manipulaci s kapalinami. Převzato a upraveno z Doulgkeroglou M.-N. a kol., 2020.

Mezi další systémy pro práci s kapalinami patří Biomek FXP nebo Hamilton STARlet, které jsou běžně využívány pro automatizovanou přípravu organoidů [52]. PLHW tak nalézají široké uplatnění při rutinní manipulaci s vysokým množstvím vzorků [51].

Pro vyšší míru flexibility a schopnost napodobení lidské manipulace v laboratoři se využívají humanoidní roboti. Příkladem tohoto systému je robot LabDroid Maholo, který dokáže provádět širokou škálu experimentálních postupů. Jeho vysoká flexibilita umožňuje jak časté změny protokolů a jejich parametrů, tak i optimalizaci kultivačních podmínek. Tento systém kombinuje 2 robotická ramena s integrovaným mikroskopem, který poskytuje data pro zpracování obrazu pomocí umělé inteligence (AI, artificial intelligence), která vyhodnocuje kvalitu rostoucích buněk. LabDroid Maholo byl úspěšně využit pro diferenciaci kmenových buněk na retinální pigmentové epitelální (RPE) buňky tak, že dokázal identifikovat optimální kultivační podmínky. Bylo prokázáno, že buňky generované programem LabDroid splňují kritéria buněčné biologie pro výzkumné aplikace v regenerativní medicíně [47].

Další robotický přístup představují rozsáhlé integrované platformy, které poskytují plnou automatizaci vícekových procesů díky propojení jednotlivých modulů pomocí centrálního ramene. Hlavní výhodou je možnost automatizace celých pracovních postupů od přípravy kultivačního média až po konečnou analýzu buněk [50]. Příkladem takového systému je platforma StemCellFactory, která se široce využívá pro automatizovanou genovou editaci pomocí CRISPR/Cas9. Tento systém umožňuje paralelní zpracování až 96 vzorků v jedné sérii, což výrazně zvyšuje kapacitu oproti manuálním metodám. Toho je dosaženo využitím 4D-Nucleofector[®] X Unit s 96jamkovým zařízením, což umožňuje optimalizovat podmínky pro kultivaci jednotlivých buněk a zároveň vytvořit plně automatizovaný systém. Hlavní výhodou tohoto systému je možnost standardizace a usnadnění postupů genové editace, které jsou při manuálním provedení časově náročné a náchylné k chybám. Využití platformy tak poskytuje srovnatelnou účinnost jako manuální postupy, ale výrazně zvyšuje reprodukovatelnost. Přestože integrované platformy, jako je StemCellFactory, vyžadují zpočátku vyšší finanční investice, díky vysoké efektivitě a přesnosti těchto procesů mohou být při dlouhodobém využívání ekonomicky přínosné [45].

2.1.2 Využití umělé inteligence a strojového učení

Využití umělé inteligence (AI) a strojového učení představuje významný pokrok v automatizaci buněčných technologií. Mimo samostatné mechanické provádění úkonů jsou

tyto systémy schopny analyzovat komplexní data, učit se z nich a přispívat k optimalizaci nebo dokonce autonomnímu řízení experimentálních procesů. Algoritmy AI jsou schopny zpracovat velké množství dat a najít v nich vzorce a souvislosti, které by člověk snadno přehlédl. To umožňuje vytvářet efektivnější automatizované systémy pro přípravu kmenových buněk a organoidů [53].

Nejvýznamnější algoritmus umělé inteligence je tzv. „deep learning“ (hluboké učení), který využívá neuronové sítě napodobující funkci lidského mozku. Tyto vícevrstevné sítě obsahují uzly podobné neuronům. Ty zpracovávají a analyzují data tak, že napodobují lidské rozhodování a rozpoznávání obrazu. Algoritmy hlubokého učení pracují s rozsáhlými datovými sadami, jako jsou mikroskopické snímky nebo genomové sekvence. Algoritmy se na těchto datech nejprve trénují, aby se naučily rozpoznávat souvislosti. Následně mohou tyto znalosti využít k analýze dalších dat, často z naprosto odlišných zdrojů, popřípadě k tvorbě prediktivních nástrojů rozpoznávajících skryté vzorce. Tímto způsobem pomáhá hluboké učení řešit složité problémy, jako je analýza mikroskopických snímků buněčných kultur nebo předpovídat optimální kultivační podmínky [54].

Hluboké učení zároveň umožňuje detailnější pochopení struktury a vývoje organoidů, a to především v oblasti zpracování obrazu. Pro analýzu obrazů histologických řezů organoidů se často využívají konvoluční neuronové sítě (CNN, convolutional neural networks), které vykazují vysokou schopnost extrahovat významné rysy z vícerozměrných obrazových dat, což je typické pro mikroskopické snímky. Algoritmy využívající CNN tak kombinují segmentaci obrazu, která slouží například k identifikaci buněk nebo organoidů, s extrakcí těchto prvků a jejich následnou klasifikací [53].

Příkladem praktického využití CNN pro práci s kmenovými buňkami je automatizovaná segmentace hiPSC pomocí modifikované U-Net architektury. Tento přístup byl vyvinut s cílem přesné identifikace a přenosu hiPSC kolonií na konci reprogramovací fáze za použití robotického systému CellX™. Model CNN hlubokého učení využitý pro segmentaci, založený na lehkém modelu U-Net s 16 konvolučními vrstvami, prokázal vysokou účinnost i na omezeném množství dat. Tento přístup tak vykazuje nejen vyšší efektivitu oproti manuálním metodám, ale také zlepšuje standardizaci a reprodukovatelnost v kultivaci kmenových buněk. Byly však zjištěny i limity této metody, jako například falešně pozitivní segmentace u částečně reprogramovaných buněk v hustých fibroblastových kulturách, které postrádaly definující hranici běžně pozorovanou u hiPSC kolonií. Avšak

i přes tyto limity představuje kombinace hlubokého učení a robotických systémů významný pokrok v automatizaci buněčných technologií [55].

Dalším příkladem využití hlubokého učení v oblasti kultivace kmenových buněk je již zmiňovaný systém StemCellFactory, který se využívá pro automatizovanou produkci a editaci hiPSC. Tento algoritmus dokáže detekovat přítomnost mrtvých nebo diferencovaných buněk z mikroskopických snímků. Zároveň dokáže kvantifikovat parametry, jako je míra konfluence nebo průměrná velikost kolonií. Tyto informace následně slouží jako vstup pro řídicí software, který se na jejich základě rozhoduje o dalším postupu, jako například o načasování pasážování buněk. Za základě toho lze nejen standardizovat proces kultivace, ale i zohlednit individuální růstové charakteristiky různých buněčných linií, což výrazně zvyšuje efektivitu [45].

Dalším příkladem propojení umělé inteligence s robotickou automatizací je také již zmiňovaný systém LabDroid Maholo. Tento systém využívá algoritmus Bayesovské optimalizace, což je pokročilá metoda strojového učení sloužící k autonomnímu vyhledávání a optimalizaci protokolů pro buněčnou diferenciaci. Například při diferenciaci iPSCs na RPE provádí robot sérii experimentů s různými kombinacemi kultivačních parametrů. Získaná data jsou předána modulu umělé inteligence, který pracuje právě na principu Bayesovské optimalizace. Modul vyhodnotí výsledky a navrhne nové kombinace kultivačních parametrů s cílem zlepšení kvality diferencovaných buněk. Takto nově navržené podmínky jsou následně aplikovány robotem s tím, že vzniká cyklus opakovaného zlepšování kultivačního protokolu a zároveň schopnosti AI efektivně predikovat a optimalizovat další kroky [47].

Zavedení umělé inteligence a strojového učení do oblasti kultivace kmenových buněk a organoidů otevírá nové možnosti pro řešení složitých vědeckých otázek a urychlení vývoje nových terapií. Cílem do budoucna je především rozvoj tzv. „vysvětlitelné umělé inteligence“ (XAI, explainable artificial intelligence), která odhaluje, jakým způsobem AI dospěla ke svým závěrům, predikcím nebo rozhodnutím. To zvyšuje důvěru při jejich využití v klinické praxi [53]. Současné metody AI dosahují sice vysoké přesnosti, jejich výstupy však mohou působit jako tzv. „černé skříňky“ (black boxes). To znamená, že způsob, jakým dospěly k výsledku zůstává nejasný. Právě XAI se snaží tyto limity překonat a poskytnout srozumitelná a interpretovatelná vysvětlení [54]. Lze předpokládat, že s dalším rozvojem a zdokonalováním AI systémů se v blízké budoucnosti stanou standardním

vybavením buněčných laboratoří, což významně urychlí jak základní výzkum, tak i vývoj personalizovaných terapeutických přístupů [53].

2.2 Digitální monitorování a analýza

V posledních letech digitální technologie významně přispěly k modernizaci kultivačních procesů v oblasti výzkumu a vývoje kmenových buněk. Zavedení sensorických systémů, „real-time monitoring“ (monitorování v reálném čase) a pokročilé analýzy dat umožňuje detailní sledování buněčného prostředí a optimalizaci kultivačních podmínek. To přispívá ke zvýšení reprodukovatelnosti a standardizace procesů spojených s kultivací a manipulací s kmenovými buňkami [56].

2.2.1 Senzory a monitorování v reálném čase

Monitorování v reálném čase poskytuje významný pokrok v oblasti monitorování procesu diferenciaci kmenových buněk. Oproti tradičním analytickým metodám, jako jsou imunobarvení, Western blot, průtoková cytometrie nebo kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR, quantitative polymerase chain reaction), umožňuje kontinuální a nedestruktivní sledování buněk v reálném čase. Schopnost kontinuálního a nedestruktivního sledování je umožněna využitím široké škály senzorů [56].

Pro sledování chemických parametrů kultivačního média se využívají elektrochemické senzory. Například inteligentní bioreaktory integrované s tenkovrstvými senzory mohou bezdrátově a v reálném čase monitorovat vlastnosti kultivace, jako je pH rozpuštěný kyslík (DO, dissolved oxygen), glukóza a teplota až po dobu 30 dnů. Tyto senzory využívají specifické materiály pro sledování jednotlivých parametrů. Například pro monitorování pH se využívá filmová pH sensorová elektroda. Snímací složka pH senzoru je potažena vrstvou oxidu iridičitého. Pro stanovení koncentrace DO se využívají platinové senzory obohacené o nanočástice niklu a platiny. Hladina glukózy může být detekována pomocí nanočástic platiny a palladia na grafenové vrstvě. Využití integrovaných systémů s více senzory umožňuje sledovat nejen průměrné hodnoty parametrů, ale i jak se tyto parametry liší v různých částech kultivačního vaku [57].

Další důležitou elektrochemickou metodou je buněčná impedanční spektroskopie (CBI, cell-based impedance spectroscopy), která měří změny elektrické impedance buněčné vrstvy v závislosti na přiloženém napětí. Využívá se především k hodnocení buněčné proliferace, životaschopnosti a diferenciaci v reálném čase a bez narušení kultivačního procesu. Zároveň díky své citlivosti na změny v adhezních vlastnostech buněk, buněčné

morfologii a struktuře buněčné vrstvy umožňuje detailní sledování dynamiky buněčných kultur [58].

Vedle elektrochemických senzorů se pro monitorování v reálném čase velmi často uplatňují optické metody. Tento přístup často využívá interakci světla s biologickým materiálem pro získání informace o morfologii nebo molekulárním složení buněk. Patří sem například fluorescenční spektroskopie, která umožňuje sledování buněk a jejich komponent po označení specifickými fluorescenčními sondami nebo nanočásticemi. Příkladem nanočástic, které díky své stabilitě umožňují monitorovat buňky po dlouhou dobu jsou grafenové kvantové tečky (GQDs, graphene quantum dots) [56].

Dále sem patří bezmarkrové optické techniky, jako je Ramanova spektroskopie a povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS, surface-enhanced Raman spectroscopy), které umožňují sledovat detailní biochemické změny během buněčné diferenciaci na molekulární úrovni. Tyto metody poskytují informace o metabolickém stavu buněk a stupni jejich diferenciaci. Přestože Ramanova spektroskopie umožňuje identifikaci a zobrazování kmenových buněk, má tato metoda i svá omezení kvůli nízkému průřezu rozptylu. To vede k zeslabení poměru signálu k šumu, což způsobuje prodloužení doby měření. Delší doba měření způsobuje poškození buněk a zároveň znesnadňuje měření velkého počtu buněk. Dalším nedostatkem je obtížnost měření jemných změn v proteinech a minerálech. Právě SERS je technika, která může významně kompenzovat tento nedostatek, protože dokáže zesílit Ramanův signál [56].

Monitorování v reálném čase představuje důležitý nástroj pro zvýšení efektivity a kvality kultivace kmenových buněk, a to především v procesu diferenciaci. Využití elektrochemických a optických senzorů poskytuje informace o kultivačním prostředí a zároveň umožňuje sledovat molekulární a metabolické změny během diferenciaci [58]. Mimo samotný sběr dat z monitorování v reálném čase je také důležité jejich zpracování a interpretace, k čemu lze využít chytré softwary a algoritmy strojového učení. Tyto systémy umožňují aktivní úpravy kultivačních podmínek na základě sběru dat [59].

2.2.2 Velká data a jejich analýza

Právě díky pokročilým technologiím, jako jsou senzory pro monitorování v reálném čase, dochází ke sběru velkého množství dat označovaných jako tzv. „big data“ (velká data). Tato data představují rozsáhlý soubor informací, které zahrnují genetiku, epigenetiku, genomiku a další „omické“ oblasti, jako je proteomika a metabolomika. Velká data

se vyznačují charakteristikami, jako jsou objem, rychlost, rozmanitost, proměnlivost, věrohodnost, možnost vizualizace a informační hodnota. Jejich analýza hraje klíčovou roli ve výzkumu kmenových buněk, neboť umožňuje komplexní pohled na buněčné populace a jejich dynamické změny v čase. To otevírá nové možnosti pro pochopení patofyziologie onemocnění a rozvoj personalizované medicíny [60].

Analýza big data nám tedy dává možnost bližší studie jednotlivých kmenových buněk. Například metoda sekvenování RNA jednotlivých buněk (scRNA-seq, single-cell RNA sequencing), které umožňuje kvantifikovat transkripční produkty jednotlivých buněk. Z těchto dat lze následně odvodit, které geny jsou v dané buňce transkribovány. Takto umožňuje scRNA-seq analýzu genové aktivity na úrovni jednotlivých buněk, což přispívá k lepšímu pochopení vzniku různých onemocnění [56].

Například u pacientů s revmatoidní artritidou umožnila tato metoda identifikovat specifické subpopulace buněk v synoviální tkáni společně s prozánětlivými fibroblasty a imunitními buňkami, které jsou klíčové v patogenezi onemocnění. Podobné přístupy byly využity při studiu systémového lupus erythematoses, kde analýza velkých dat odhalila změny v genové expresi ledvinných buněk [60].

Využití velkých dat v kombinaci s hPSCs zároveň přineslo pokrok v oblasti modelování neuronových poruch, jako je autismus. Bylo zjištěno, že mnoho genů spojených s autismem je aktivních už během prenatálního vývoje. Tyto informace z velkých dat jsou důležité, protože pomáhají cíleně vytvářet mozkové buňky pro studium autismu. Zavedením genetické změny spojené s autismem do hPSCs a jejich následnou diferenciací na mozkové buňky je možné zkoumat příčinu onemocnění. Analýza velkých dat tak pomáhá lépe porozumět patofyziologii autismu a zároveň usnadňuje využití kmenových buněk pro jeho výzkum [61].

I přes své přínosy má analýza velkých dat v oblasti kultivace kmenových buněk i řadu výzev. Patří sem například nutnost zpracování a interpretace rozsáhlých datových souborů, které vyžadují pokročilé bioinformatické nástroje a výpočetní techniky [60]. Aby byly výsledky spolehlivé, je potřeba analyzovat velké množství vzorků, což je drahé a časově náročné. Mnoho studií tak pracuje s menším počtem buněk, což může omezit věrohodnost výsledků [61].

3 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs)

3.1 Definice a charakteristika iPSCs

Indukované pluripotentní kmenové buňky jsou specifickým typem pluripotentních kmenových buněk odvozených z dospělých somatických buněk pomocí genetického reprogramování. Toho je dosaženo vynucenou expresí specifických genů a faktorů zodpovědných za pluripotenci [62]. iPSCs se v mnoha ohledech podobají ESCs, a to především svou schopností sebeobnovy a diferenciaci do všech tří zárodečných vrstev (ektoderm, mesoderm a endoderm) [63]. iPSCs jsou získávány ze somatických tkání a zdroje buněk pro jejich tvorbu jsou snadno dostupné, nejsou s nimi spojena minimální etická omezení v porovnání s ESCs, které se získávají z lidských embryí. Další výhodou je možnost generovat iPSCs přímo z buněk pacienta, čímž se zabrání imunitnímu odmítnutí [64].

3.2 Historie objevu a vývoj technologií

Významný pokrok v oblasti iPSCs nastal v roce 2006, kdy Kazutoshi Takahashi a Shinya Yamanaka vytvořili první linie iPSCs, reprogramováním myších fibroblastů s využitím pouze čtyř transkripčních faktorů – *Oct4* (Octamer-binding transcription factor 4), *Sox2* (SRY-box transcription factor 2), *Klf4* (Krüppel-like factor 4) a *c-Myc* (cellular Myelocytomatosis oncogene), redukovanými z 24 faktorů [64]. Jen o rok později, v roce 2007, Yamanakova skupina a nezávisle na ní i tým Jamese Thomsona ve Spojených státech publikovaly studie popisující generaci lidských iPSCs z fibroblastů s využitím mírně odlišných kombinací transkripčních faktorů. V roce 2012 získal Shinya Yamanaka společně s Johnem Gurdonem Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu díky objevu, že dospělé somatické buňky lze reprogramovat do pluripotentního stavu [65]. Vývoj technologií pro generování iPSCs se od té doby rychle vyvíjel. Hlavním cílem bylo zvýšení efektivity, bezpečnosti a klinické využitelnosti těchto metod [64].

3.3 Metody reprogramování somatických buněk na iPSCs

3.3.1 Genetické metody

Mezi genetické metody reprogramování somatických buněk na iPSCs patří využití virových a nevirálních vektorů. Virové vektory lze dále klasifikovat na integrační a neintegrační. Původní přístupy využívaly především integrační virové vektory, jako jsou retroviry a lentiviry, které do genomu buněk vnašely geny kódující OSKM (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* a *c-Myc*) transkripční faktory, což vedlo k indukci pluripotentního stavu [66]. To však mohlo vést k nepředvídatelným následkům, protože vložení virové DNA do genomu buňky mohlo

docházet k náhodné aktivaci nebo deaktivaci genů a k celkově snížené účinnosti reprogramování [67]. K řešení těchto problémů bylo vyvinuto několik neintegračních technik, které umožňují navodit pluripotenci v somatických buňkách bezpečnějším způsobem a bez nutnosti vkládání cizí DNA do genomu [64].

Mezi tyto techniky patří například využití adenovirů, adeno-asociovaných virů (AAV) nebo Sendai viru (SeV). Klíčovou výhodou těchto technik je, že jsou z proliferujících iPSCs postupně eliminovány, což vede k reprogramování bez trvalé integrace OSKM nebo narušení genomu buňky [66]. Adenoviry umožňují přechodnou expresi transgenů, ale mají nízkou účinnost. SeV je RNA virus, který se replikuje v cytoplazmě hostitelské buňky a nemá DNA meziproduct, čímž se eliminuje riziko integrace do genomu. SeV vektory tak umožňují efektivní expresi transkripčních faktorů a tvorbu iPSCs bez transgenů [64].

Dále se uplatňují také neviróvé genetické metody, které minimalizují rizika spojená s použitím virů a často nabízejí jednodušší manipulaci. Významnou roli zde hrají epizomální vektory (plazmidy) odvozené od Epstein-Barr viru (EBV). Tyto plazmidy nesou geny pro transkripční faktory a díky specifickým prvkům z EBV se mohou v jádře buňky samostatně replikovat bez nutnosti začlenění do hlavní chromozomální DNA buňky [68]. Významnou výhodou je, že během replikace buňky epizomální plazmidy postupně vymizí. Díky tomu se epizomální vektory na bázi plazmidů často využívají pro tvorbu iPSCs určených pro klinická využití. Jejich účinnost je téměř srovnatelná s metodami využívajícími SeV, avšak za výrazně nižších nákladů a bez rizik spojených s využitím virových vektorů [66].

3.3.2 Chemické metody

Chemické reprogramování je založené na vystavení somatických buněk chemickým koktejlům malých molekul, což umožňuje generovat požadované typy buněk, včetně iPSCs pro biomedicínské aplikace přesným a snadno kontrolovatelným způsobem [69]. Protože tento přístup nevyžaduje genetickou modifikaci buněk, eliminuje tak rizika spojená s integrací transgenů. Ve srovnání s genetickými přístupy fungují malé molekuly rychle, reverzibilně a jejich účinek je závislý na použité dávce a době působení, což dává přesnou kontrolu nad osudem buněk [70].

Bylo zjištěno, že inhibitory histonových deacetyláz (HDAC), jako je kyselina valproová (VPA), zvyšují účinnost genetického reprogramování a mohou nahradit funkci onkogenu *c-Myc* u myších buněk, nebo dokonce *c-Myc* a *Klf4* u lidských buněk. Postupný

vývoj se soustředil na identifikaci kombinací malých molekul schopných indukovat pluripotenci samostatně, bez nutnosti dodání exogenních genů. Toho bylo dosaženo využitím koktejlů obsahujících VPA, inhibitory kináz, a další látky ovlivňující buněčnou signalizaci a epigenetiku. To umožnilo aktivaci endogenních genů pluripotence, včetně faktoru *Oct4* a navodit tak pluripotentní stav [69].

Přestože chemické reprogramování nabízí řadu výhod oproti genetickým metodám, stále probíhá výzkum zaměřený především na zvýšení účinnosti pro jejich širší využití v klinické praxi [70].

3.3.3 Epigenetické modifikace

Právě epigenetické modifikace hrají zásadní roli při reprogramování somatických buněk na iPSCs, protože tento proces vyžaduje přestavbu epigenetického profilu, což zahrnuje změny v metylaci DNA, modifikacích histonů a remodelaci chromatinu. Hlavním cílem je překonání epigenetických bariér, které udržují jejich diferencovaný stav a inhibují geny pluripotence, jako *Oct4* a *Nanog* [71]. Přestože by mělo dojít k úplné přestavbě epigenetické krajiny somatických buněk do pluripotentního stavu, tento proces bývá často neúplný. To se projevuje přetrváváním některých epigenetických znaků původních somatických buněk a zároveň nízkou účinností reprogramování, která často nepřesahuje 1 % [72].

Mezi příklady epigenetických bariér patří udržování kondenzovaného chromatinu v místech pluripotentních genů, přetrvávající hypermethylace promotorů genů pluripotence, která brání jejich aktivaci, a nedostatečné epigenetické umlčení genů specifických pro původní somatickou buňku. Tyto neúplné epigenetické změny jsou tak příčinou nestabilního pluripotentního stavu, což omezuje jejich využití v klinických aplikacích [72]. Pro zlepšení účinnosti reprogramování tak byly navrženy postupy, které zahrnují přísávek malých molekul, které ovlivňují aktivitu DNA metyltransferáz nebo histondeacetyláz, čímž pomáhají aktivovat pluripotentní geny [71].

3.3.4 Postup přípravy iPSCs

Prvním krokem pro přípravu iPSCs je volba typu somatických buněk, které mají být reprogramovány. Přestože lze teoreticky jakoukoli buňku převést do pluripotentního stavu, existují důkazy, že některé buňky se reprogramují snadněji. Záleží také na invazivitě odběru a náročnosti kultivace. Dříve se jako nejčastější zdroj somatických buněk využívaly kožní fibroblasty. Jedná se však o invazivní postup, protože vyžaduje kožní biopsii. V posledních letech se proto stále více využívají mononukleární buňky periferní krve (PBMCs), které lze získat minimálně invazivním způsobem z rutinního odběru venózní krve [73].

Pro izolaci PBMCs se odebírají 2–4 ml lidské venózní krve do zkumavek obsahujících heparin jako antikoagulant. Po odběru se ke vzorku krve přidá stejný objem fosfátového pufru (PBS) a nanese na vrstvu separačního roztoku, jako je Ficoll-Paque™. Po důkladném promíchání probíhá gradientová centrifugace při $500\text{--}1000 \times g$ po dobu 20–30 minut při pokojové teplotě. Čím větší je objem krve, tím vyšší odstředivá síla je potřeba. Centrifugací dojde k oddělení PBMCs, které se nacházejí v bílém prstenci mezi plazmou a erytrocyty. Tento bílý prstenec je opatrně odebrán automatickou pipetou a několikrát promyt PBS pufrům pro odstranění kontaminujících složek. Takto izolované PBMCs jsou připraveny pro reprogramování [74].

Klíčovým krokem reprogramování je doručení transkripčních faktorů do PBMCs pomocí elektroporace. To se provádí nevírovou metodou pomocí epizomálních plazmidových vektorů obsahujících geny kódující faktory OSKM [75]. Před samotnou elektroporací se připraví roztok plazmidové DNA o koncentraci $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, který obsahuje plazmidy kódující OSKM faktory. Poté se připraví potřebný počet PBMCs, což je obvykle $1\text{--}5 \times 10^6$ buněk na jednu elektroporaci. Tato suspenze se zcentrifuguje při $200 \times g$ po dobu 10 minut při pokojové teplotě a supernatant se odstraní. Buněčná peleta se opatrně resuspenduje v $100 \mu\text{l}$ elektroporačního roztoku 4D-Nucleofector™ obsahujícího doporučené množství plazmidové DNA, které se často uvádí jako $3 \mu\text{g}$. Tato směs obsahující $1\text{--}5 \times 10^6$ PBMCs, $100 \mu\text{l}$ elektroporačního roztoku a plazmidové DNA se následně převede do elektroporační kyvety (Nucleocuvette™ Vessel). Kyveta se vloží do přístroje a spustí se program, který trvá pouze 3–5 sekund [74].

Po dokončení elektroporace se doporučuje kyvetu nechat alespoň 5 minut v inkubátoru při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a $5\% \text{ CO}_2$ [75]. Poté se obsah kyvety převede na destičku potaženou vhodnou ECM. Využívá se zde například Geltrex nebo Matrigel [74] [76]. Buňky se kultivují

v reprogramovacím médiu StemSpan™-XF společně se StemSpan™ CC100. Po 4 hodinách inkubace je nutné toto médium vyměnit, protože transfekční roztok by mohl poškodit buňky. Tento moment je označován jako den 0 reprogramování. Následující dny jsou klíčové pro úspěšnou epigenetickou přestavbu a vznik iPSC kolonií [74].

Třetí den od elektroporace se buňky přenesou na novou destičku potaženou Geltrexem nebo Matrigelem. Čtvrtý den se do každé jamky destičky k reprogramovacímu médiu přidá 200 µl mTeSR™1, což je specifické médium pro kultivaci iPSCs. Mezi šestým a desátým dnem se odebírá 1 ml média a centrifuguje se při $300 \times g$ po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Buněčná peleta se resuspenduje v 1,2 ml mTeSR™1 a buňky se opět přenesou do původní jamky. Jedenáctý den je reprogramovací médium plně nahrazeno mTeSR™1 médiem, které by mělo být denně vyměňováno [74] [76].

První kolonie iPSCs se obvykle tvoří mezi 10–20 dnem od elektroporace. Jakmile jsou tyto kolonie dostatečně velké, je pod mikroskopem při zvětšení $10\times$ odstraněna většina média kolonie iPSCs se rozdělí na menší fragmenty, které se přenesou na menší destičku opět potaženou Geltrexem nebo Matrigelem [74]. Kultivace probíhá v mTeSR™1 s přidavkem inhibitoru Rho-asociované kinázy (ROCK, Rho-associated protein kinase), jako je Y-27632, v inkubátoru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5% CO_2 . Tento inhibitor podporuje přežití a uchycení buněk prvních 24 hodin po přenesení do média [74] [76]. Médium se následně každý den obměňuje již bez přidavku inhibitoru. Jakmile buňky pokryjí přibližně 70 % povrchu kultivační jamky, což se označuje jako 70% konfluence, jsou pasážovány do větších destiček, čímž se získávají nové linie iPSCs [74].

4 Postupy přípravy organoidů z iPS buněk

4.1 Specifické postupy pro různé typy organoidů

Generace organoidů z iPSCs představuje významný pokrok v oblasti modelování lidských orgánů *in vitro*. Princip je založen na řízené diferenciaci iPSCs do specifických buněčných linií pomocí signálních molekul a růstových faktorů s využitím extracelulární matrix, jako je Matrigel. Tyto buněčné linie podléhají samoorganizaci do 3D struktur, které připomínají cílový orgán. Přestože základní postup jako je řízená diferenciaci a samoorganizace do 3D struktur zůstává zachován, protokoly pro tvorbu různých typů organoidů se liší. Tyto odlišnosti zahrnují především výběr a načasování aplikace růstových faktorů a signálních molekul, které jsou specifické pro konkrétní orgán [5].

4.1.1 Mozkové organoidy

Při tvorbě mozkových (cerebrálních) organoidů je prvním krokem diferenciací pluripotentních kmenových buněk do ektodermu, který je právě klíčový pro vývoj nervové tkáně. *In vitro* je toho dosaženo tvorbou 3D agregátů zvaných embryoidní tělesa (EBs, embryoid bodies). Tyto EBs jsou poté kultivovány ve specifických médiích obohacených o inhibitory BMP a aktivátory Wnt drah, které selektivně podporují vývoj neuroektodermu a inhibují vývoj ostatních zárodečných linií [77]. Kultivace v suspenzi, často s využitím rotujících bioreaktorů, které zlepšují přívod živin a kyslíku, umožňuje růst velkých organoidů i přes nedostatek cévního zásobení [78].

Vzniklé cerebrální organoidy jsou produktem spontánní samoorganizace buněk do 3D struktur a připomínají rané vývojové stádium mozku [78]. Pro tuto samoorganizaci je nutné buňkám poskytnout vhodné trojrozměrné kultivační prostředí, což nejčastěji zahrnuje využití ECM, jako je Matrigel [79]. Takto připravené mozkové organoidy poskytují významnou příležitost nejen ke studiu vývoje mozku, ale také specifických neurologických chorob, jako je mikrocefalie, která je sekundární k infekci virem Zika [80].

4.1.2 Střevní organoidy

Příprava střevních organoidů vyžaduje odlišný postup, kde jsou iPSCs nejprve diferencovány směrem k definitivnímu endodermu (DE) s využitím aktivinu A jako signální molekuly [81]. Aktivin A indukuje expresi transkripčních faktorů SOX17 (SRY-box transcription factor 17) a FOXA2 (forkhead box protein A2), které jsou klíčové pro vznik a vývoj endodermu, zatímco potlačují ostatní zárodečné linie. V průběhu gastrulace pak tento endoderm dává vzniku střevnímu epitelu [82].

Dalším krokem je diferenciací buněk směrem k posteriornímu typu endodermu, což je důležité pro vývoj struktur středního a zadního střeva [81]. Toho je dosaženo kombinací růstového faktoru FGF4 (fibroblast growth factor 4) a CHIR99021, který aktivuje Wnt dráhu. Tato kombinace způsobí expresi střevního markeru CDX2 (caudal type homeobox 2), který vede k shlukování buněk, čímž se vytvoří malé sféroidy [81] [82]. Sféroidy jsou 3D struktury připomínající rané stádium střevní tkáně. Tyto sféroidy jsou následně vloženy do ECM, nejčastěji Matrigelu bohatého na laminin [82].

ECM tak poskytuje mechanickou oporu pro 3D růst, ale i bioaktivní signály, které napodobují přirozené mikroprostředí střevní tkáně. V ECM sféroidy dále dozrávají v přítomnosti speciálního média obohaceného o růstové faktory jako jsou Noggin, což

je inhibitor BMP signální dráhy, EGF a R-spondin, který posiluje Wnt signalizaci. Díky tomu dochází k samoorganizaci buněk do složitých struktur připomínajících epitel tenkého nebo tlustého střeva. Takto vzniklé střevní organoidy jsou využívány ve výzkumu, testování léků nebo studiu střevních onemocnění [81].

4.1.3 Žaludeční organoidy

Příprava žaludečních organoidů z iPSCs je víceetapový proces, který vyžaduje důkladnou optimalizaci každého z těchto kroků [83]. Nejprve dochází ke kultivaci iPSCs v systému bez podpůrných buněk, jako jsou myši embryonální fibroblasty [84]. iPSCs jsou tak kultivovány na destičkách potažených iMatrix-511, který podporuje adhezi a růst buněk. Buňky jsou udržovány v médiu StemFit™, které zajišťuje udržení pluripotence a je obohacené o penicilin a streptomycin pro prevenci případné bakteriální kontaminace. Kultivace probíhá v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ a s pravidelnou výměnou média každých 48 hodin. Pro zajištění vysoké viability buněk během pasážování se využívají inhibitory ROCK, které podporují přežití a adhezi buněk po jejich oddělení [85].

Proces diferenciací začíná indukci iPSCs do definitivního endodermu pomocí aktivinu A v RPMI-1640 médiu po dobu tří dnů [83] [85]. Tento krok aktivuje Nodální signální dráhu, která je důležitá pro formování předního střeva, které slouží jako embryonální prekurzor pro formování žaludku [86]. Pro podporu diferenciací se do média přidávají suplementy, jako je kostní morfogenetický protein 4 (BMP4), směs B27 a L-glutamin. Zároveň se postupně zvyšuje koncentrace fetálního bovinního séra (FBS, fetal bovine serum) v médiu z 0 % na 2 %, což přispívá k diferenciaci do DE. Účinnost diferenciací lze ověřit analýzou exprese transkripčních faktorů SOX17 a FOXA2, což jsou markery potvrzující zformování definitivního endodermu [85].

Následně probíhá transformace 2D vrstvy buněk DE na 3D sféroidy zadní části předního střeva. Využívá se teplé médium složené z RPMI s přísávkem 2% FBS, 2 μM CHIR99021, 500 ng/ml FGF4 a 200 ng/ml Noggin, Toto médium indukuje vznik 3D struktur, které signalizují počátek tvorby sféroidů. Poté se k médiu přidává kyselina retinová, čímž se podpoří specifikace žaludeční linie. Vzniklé sféroidy plavou volně v médiu, kdy jejich kvalita a schopnost vyvinout se v žaludeční organoidy je závislá na jejich množství. Produkce vyššího počtu sféroidů (600–800 na jamku) vede k lepší diferenciaci a vyšší kvalitě vzniklých žaludečních organoidů [83].

Sféroidy se odsají, nechají sedimentovat a následně smíchají s ledově studeným Matrigelem. Z této suspenze se odebere 50 µl do středu jamky v 24jamkové destičce s povrchem Nunclon™ Delta. Tento povrch zajišťuje optimální podmínky pro formování Matrigelových kuliček. Je důležité, aby se kulička nedotýkala stěn jamky a nedošlo k jejímu roztečení. To by narušilo 3D organizaci buněk a zhoršilo kvalitu vzniklých žaludečních organoidů. Připravená destička se vloží na 10–15 minut do inkubátoru pro tkáňové kultury (37 °C, 5% CO₂), kde Matrigel zcela ztuhne [83].

Po jeho ztuhnutí se do každé jamky přidá specifické kultivační médium, jehož složení se liší dle typu cílových žaludečních organoidů. Pro specifikaci antrální linie se využívá například kyselina retinová a Noggin, zatímco pro fundické organoidy je klíčová aplikace CHIR99021 a fibroblastový růstový faktor 10 (FGF10, fibroblast growth factor 10), který zesiluje glandulární morfogenezi řízenou CHIR [87]. Pro indukci plně funkčních parietálních buněk, které jsou zodpovědné za sekreci kyseliny chlorovodíkové, je nutné přidat BMP4 společně s inhibitorem mitogenem aktivované proteinové kinázy (MEK, mitogen-activated protein kinase) PD0325901 [83].

Během další kultivace organoidy morfologicky dozrávají. Oba typy exprimují obecné markery žaludečního epitelu, jako jsou SOX2 a GATA4. Antrální organoidy se vyznačují vysokou expresí transkripčního faktoru PDX1 a formují vnitřní žlázové struktury, zatímco fundické organoidy tvoří vnější žlázové výběžky. Po asi 34 dnech jsou žaludeční organoidy plně vyvinuty a připraveny pro experimentální využití [83].

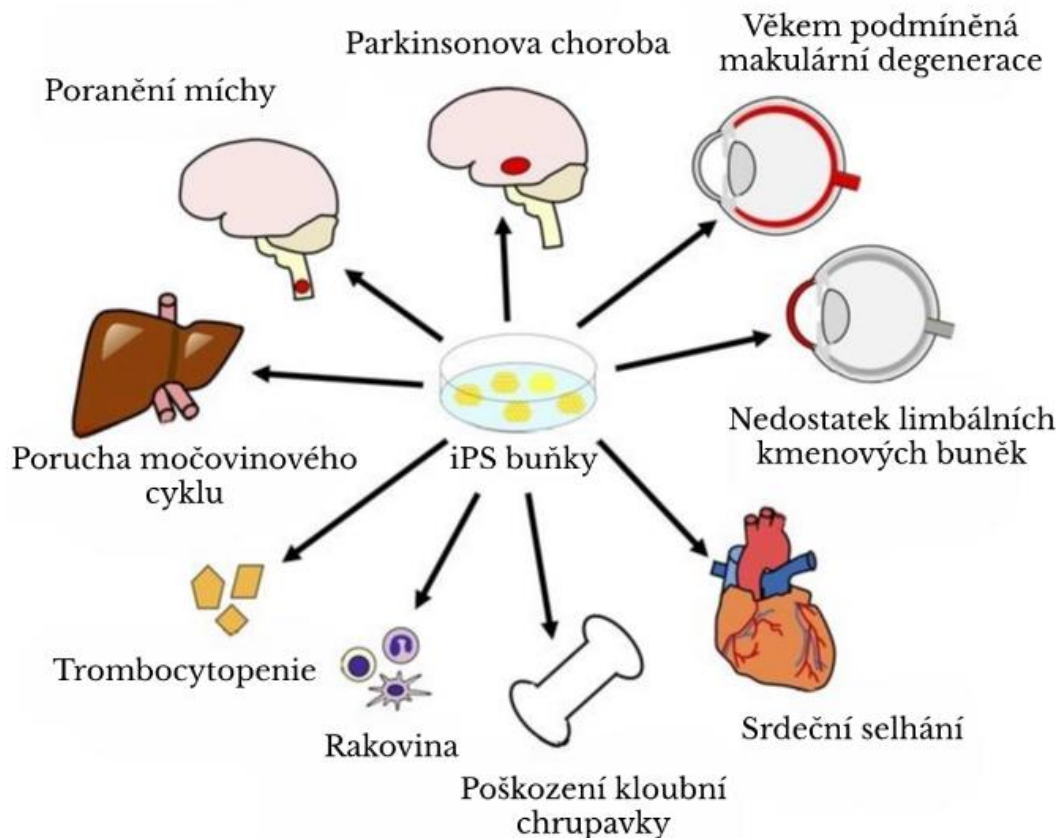
5 Využití iPS buněk v biomedicinském výzkumu

5.1 Regenerativní medicína

Indukované pluripotentní buňky představují významný pokrok v oblasti regenerativní medicíny díky neomezené schopnosti proliferace a diferenciaci do různých typů buněk a tkání [88]. Hlavní výhodou je možnost jejich přípravy přímo ze somatických buněk pacienta, což umožňuje autologní transplantaci bez rizika imunitního odmítnutí. Tím se zároveň snižují etická omezení spojená s využitím ESCs. Právě díky těmto vlastnostem představují iPSCs vysoký potenciál pro klinické využití především v oblastech, kde dochází k nevratnému poškození tkání [89].

Klinické studie využívající iPSCs probíhají již po celém světě a zahrnují více než deset onemocnění. Mezi nejčastěji studované patří Parkinsonova choroba, věkem podmíněná

makulární degenerace (AMD, age-related macular degeneration), diabetes mellitus 1. typu nebo srdeční selhání. Například u Parkinsonovy choroby je cílem transplantace dopaminergních neuronů odvozených z iPSCs pro obnovení produkce dopaminu v mozku [90]. AMD je progresivní onemocnění makulární oblasti sítnice, které způsobuje postupné zhoršování centrálního vidění. V pozdních stádiích vede ke ztrátě centrální zrakové ostrosti, což vede k těžkému a nevratnému poškození zraku [91].



Obrázek 4: Příklad probíhajících klinických studií využívajících iPSCs. Převzato a upraveno z Tsujimoto H. a kol., 2021.

Tým Masayo Takahashi provedl v této oblasti výzkum zaměřující se na proveditelnost transplantace buněčných vrstev RPE, diferencovaných z iPSCs získaných z kožních fibroblastů dvou pacientů s neovaskulární AMD [91]. Tyto autologní iPSC-RPE buňky prošly před samotnou transplantací důkladným testováním kvality a bezpečnosti. Testování zahrnovalo ověření profilů DNA metylace a genové exprese, které se musely shodovat s profily tkáně RPE. Dále se pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce detekovali v jednotlivých buňkách hladiny genové exprese specifické pro RPE, které musely být také shodné s hladinami tkáně RPE. Testy tumorogenicity proběhly na imunodeficientních myších, kde nebyl pozorován žádný růst tumoru [92].

První pacientka nejprve podstoupila standardní léčbu založenou na injekčním podávání anti-VEGF léčiv po dobu 29 měsíců. Její zraková ostrost v postiženém oku se však stále zhoršovala, proto u ní byl proveden chirurgický zákrok. Ten zahrnoval odstranění neovaskulární membrány a transplantaci autologní vrstvy RPE buněk pod sítnici. Rok po operaci zůstala transplantovaná vrstva neporušená, bez známek odmítnutí. Nedošlo sice ke zlepšení zrakové ostrosti, ale ani ke zhoršení. Pacientka po operaci již nepotřebovala další injekce anti-VEGF a subjektivně vnímala své vidění jako ostřejší, což bylo pravděpodobně způsobeno odstraněním neovaskulární membrány. U druhého pacienta byly v iPSCs detekovány aberace DNA. Protože dopad genetických nálezů na tumorigenicitu nebyl plně objasněn, a také proto, že neovaskulární membrána u tohoto pacienta vykazovala středně dobrou odpověď na standardní anti-VEGF terapii, transplantace u tohoto pacienta neproběhla [92].

Přestože transplantace byla provedena jen u jedné pacientky, představuje tato studie průkopnický objev v oblasti iPSC-založených transplantací. Výsledky potvrdily bezpečnost a proveditelnost autologní transplantace RPE buněk diferencovaných z iPSCs. Tato studie tak otevřela nové možnosti pro další klinické studie [91] [92].

Další významnou aplikací iPSCs je léčba srdečního selhání. Tento stav je často spojen s kardiomyopatií, což je onemocnění srdečního svalu, vedoucí k jeho oslabení nebo strukturálním změnám [93]. Tým Yoshiki Sawa publikoval studii, kde popisují první úspěšnou transplantaci alogenních štěpů (patches), tvořených kardiomyocyty derivovanými z iPSCs, pacientovi s těžkou ischemickou kardiomyopatií. Tyto buňky prošly před samotným využitím přísnými testy kvality a zároveň vykazovaly typické kardiogenní vlastnosti, jako je schopnost spontánního tepu nebo produkci cytokinů, které indukují angiogenezi. Test bezpečnosti proběhl na imunodeficientních myších, kde nebyla prokázána tumorigenicita ani přítomnost genetických mutací [94].

Transplantace byla následně provedena chirurgicky, kdy byly 3 štěpy, které dohromady obsahovaly přibližně 100 milionů kardiomyocytů, umístěny do epikardu levé komory v oblasti přední a boční stěny. Po operaci byla pacientovi po dobu 3 měsíců podávána imunosupresivní léčba, která byla poté ukončena bez komplikací. Šest měsíců až rok po operaci došlo u pacienta ke zlepšení klinických symptomů a ke zvýšení tolerance k zátěži. Tato studie tak představuje první úspěšné využití iPSC-derivovaných kardiomyocytů u pacienta se srdečním selháním a otevírá tak nové možnosti léčby tohoto onemocnění [94].

5.2 Modelování nemocí

Další významné využití nacházejí iPSCs v oblasti modelování lidských nemocí. Díky své schopnosti diferenciaci do prakticky jakéhokoliv buněčného typu umožňují iPSCs vytvářet *in vitro* modely, které věrně napodobují patologické procesy specifické pro konkrétní onemocnění [95]. Doposud se běžně využívaly zvířecí modely ke studiu lidských nemocí, ty neumožňovaly přesnou shodu s patofyziologií lidských onemocnění. Další *in vitro* modely onemocnění byly často založeny na 2D kultuře nesmrtelných lidských rakovinných buněčných linií. Přestože tyto buněčné linie poskytly v minulosti cenné informace, nejsou schopny věrně napodobit lidská onemocnění s ohledem na individuální rozdíly mezi pacienty [96].

Právě zde poskytují iPSCs řešení tak, že umožňují vytvoření buněk odvozených od pacienta, které nesou všechny genetické změny, které jsou základem konkrétního onemocnění. Tyto modely jsou důležité především pro studium onemocnění obtížně dostupných tkání, jako je nervová, srdeční nebo pankreatická tkáň [97]. Tyto modely nemocí *in vitro* následně umožňují detailní studium molekulárních a buněčných mechanismů, které se podílejí na vzniku a progresi daného onemocnění [96].

Modely iPSCs jsou nejčastěji využívány pro studium neurodegenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova nebo Alzheimerova choroba (AD, Alzheimer's disease), dále u kardiovaskulárních chorob a některých typů rakoviny [98] [99]. U neurologických onemocnění umožňují neurony derivované z iPSCs studovat různé procesy, jako je tvorba amyloidních plaků nebo dysfunkce dopaminergních neuronů, které by u živých pacientů byly pro výzkum prakticky nedostupné [100].

Alzheimerova choroba se ve více než 95 % případů vyskytuje ve sporadické formě (SAD, sporadic Alzheimer's disease), která je způsobena kombinací genetických a environmentálních faktorů [95]. Méně častá, ale agresivnější je familiární forma (FAD, familial Alzheimer's disease), která je způsobena autozomálně dominantními mutacemi v genech *APP* (amyloid precursor protein), *PSEN1* (presenilin 1) nebo *PSEN2* (presenilin 2). Technologie iPSCs umožňuje vytvářet pacient specifické modely, které věrně zachycují patologické procesy charakteristické pro každou z těchto forem. Tato technologie hraje zásadní roli především u SAD, protože nabízí možnost studovat interakce mezi různými rizikovými faktory [98].

Hlavním genetickým rizikovým faktorem pro SAD je polymorfismus v genu pro apolipoprotein E (APOE). S vyšším rizikem rozvoje onemocnění je nejčastěji spojována alela APOE4 [96]. Pro bližší studium vlivu této alely je důležité vytvořit izogenní iPSCs linie. Jedná se o linie, které se liší pouze v cílovém genu, zatímco zbytek jejich genetické informace je identický. K tomuto účelu se využívají techniky genomového editování, jako je CRISPR/Cas9, kdy se v jedné iPSCs linii cíleně změní pouze sledovaný gen (např. alela APOE3 na APOE4) a zbytek genomu zůstává nezměněn [100]. Tím se eliminuje vliv ostatních genetických odlišností mezi dárci buněk. Tyto linie se následně diferencují do neuronů, mikroglíí a astrocytů, což umožňuje sledovat, jak APOE4 ovlivňuje vznik a rozvoj AD v jednotlivých buněčných typech [95].

Zároveň bylo prokázáno, že neurony s alelou APOE4 vykazují zvýšenou produkci amyloidu-beta 42 (A β 42). Tato forma A β má vysokou schopnost agregovat a tvořit nerozpustné agregáty, které jsou hlavní složkou amyloidních plaků, což je jeden z hlavních patologických znaků AD. Amyloidní plaky narušují funkci neuronů, způsobují zánětlivé procesy a přispívají k celkové neurodegeneraci [95]. Tyto neurony také vykazují vyšší hladiny hyperfosforylovaného proteinu tau, který tvoří agregáty. Ty jsou hlavní složkou neurofibrilárních klubek (NFTs, neurofibrillary tangles), které jsou dalším charakteristickým znakem AD a přispívají k dysfunkci a zániku neuronů [100].

U astrocytů derivovaných z iPSCs bylo prokázáno, že přítomnost alely APOE4 narušuje jejich schopnost odstraňovat A β z extracelulárního prostoru, což vede k akumulaci cholesterolu uvnitř buněk. Mikrogliové buňky jsou zodpovědné za fagocytózu patogenů a buněčného odpadu, včetně agregátů A β . Studie na mikroglíích derivovaných z iPSCs prokázaly, že buňky s alelou APOE4 mají často narušenou schopnost fagocytózy agregátů A β a vykazují zvýšenou produkci prozánětlivých faktorů. Tento stav může přispívat k progresi neurodegenerativních procesů v mozku pacientů s AD [100].

V oblasti modelování nemocí tak iPSCs umožňují vytvářet *in vitro* modely specifických buněčných typů postižených chorobou, jako jsou v případě AD neurony, astrocyty nebo mikrogliové buňky [96]. Tyto modely umožňují studovat patofyziologické procesy na buněčné úrovni u jednotlivých pacientů. Modely iPSCs tak významně přispívají k porozumění molekulárním mechanismům řady genetických, neurodegenerativních a kardiovaskulárních onemocnění [99].

5.3 Testování léčiv

V posledních letech se iPSCs staly nepostradatelným nástrojem pro výzkum a vývoj nových léčiv. Tento přístup představuje významný pokrok oproti tradičním zvířecím modelům, protože je méně nákladný, není spojen s etickými problémy a umožňuje věrně napodobit genetickou výbavu pacienta. Specifické genetické pozadí pacienta může ovlivnit reakci na podávaná léčiva a vyvolat nežádoucí vedlejší účinky. Z tohoto důvodu jsou iPSCs derivované od jednotlivých pacientů důležité při screeningu léků a hodnocení jejich bezpečnosti. iPSCs modely tak umožňují testovat léčiva přímo na buňkách odvozených od pacientů s konkrétním onemocněním [101].

Díky schopnosti iPSCs technologií generovat prakticky jakýkoli typ buněk postižených daným onemocněním, můžeme hodnotit účinky léčiv pro konkrétní buněčné populace, které jsou u tradičních buněčných linií často nedostupné. Při testování účinnosti léčiv jsou pacient-specifické modely využívány k screeningu stovek až tisíců různých chemických látek. Účelem je identifikace látek, které jsou schopny zmírnit nebo zvrátit patologický fenotyp. Příkladem je snížení produkce toxického A β v případě Alzheimerovy choroby [102].

V současnosti existují pouze 2 schválené klinické léčby AD, inhibitory acetylcholinesterázy a antagonistu receptoru N-methyl-D-aspartátu. Oba tyto přístupy však vykazují omezenou účinnost. iPSC technologie se zaměřuje na diferenciaci neuronů od pacientů s AD nebo Downovým syndromem (DS, Down syndrome), které reprodukuje klíčové patologické znaky onemocnění, jako jsou agregáty A β a neurofibrilární klubka proteinu tau. Bylo prokázáno, že neurony odvozené z iPSCs pacientů s DS vykazují zrychlený rozvoj patologií AD. Tyto modely se tak prokázaly jako účinný nástroj pro screening nových léčiv [103]. Příkladem je neuroprotektivní sloučenina n-butyldenftalid, jejíž testování prokázalo schopnost zmírnit patologii spojenou s proteinem tau a zvýšit aktivaci signální dráhy Wnt v neuronech derivovaných z iPSCs pacientů s DS [104].

V roce 2017 bylo využito 13 linií iPSCs od pacientů s AD ke screeningu 1258 farmaceutických sloučenin. Přestože se podařilo identifikovat koktejl léčiv (bromokriptin, kromolyn a topiramát), který účinně snižoval poměr A β ₄₂/A β ₄₀, jeho účinek byl však pozorován jen u familiární formy AD [103].

Přestože technologie iPSCs přináší řadu výhod, její využití je spojeno i s řadou omezení. Hlavní nevýhodou je technická náročnost a časová spotřeba při generování

a diferenciaci iPSCs, což může prodlužovat proces vývoje léčiv. Další nevýhodou zůstává nezralý fenotyp diferencovaných buněk, které často připomínají spíše fetální než dospělé buňky, což může ovlivnit jejich reakci na léčiva [102]. Variabilita mezi jednotlivými iPSCs liniemi je další překážkou, která může vést k odlišným výsledkům. Proto je nutné dodržet a přísnou standardizaci protokolů pro zajištění reprodukovatelnosti [105]. I přes tyto nevýhody představují technologie iPSCs velký pokrok ve farmaceutickém průmyslu [106].

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout nejnovější trendy v kultivaci kmenových buněk se zaměřením na indukované pluripotentní kmenové buňky. Práce se věnovala pokročilým kultivačním technikám, jako jsou bioreaktory a dynamické kultivační systémy, které věrně napodobují přirozené mikroprostředí buněk, čímž podporují jejich proliferaci, diferenciaci a zároveň zvyšují výtěžnost buněk.

Inovativní materiály, jako jsou biomimetické materiály a nanotechnologie, poskytují buňkám nezbytnou strukturální oporu v podobě scaffoldů. Vlastnosti nanomateriálů, jako je vysoká reaktivita a schopnost funkcionalizace povrchu zlepšují proliferaci, diferenciaci a cílený transport buněk. Dalším trendem jsou genetické a molekulární přístupy, které se zaměřují především na technologii CRISPR/Cas9, která umožňuje přesné úpravy genomu a kontrolu epigenetických mechanismů.

Práce dále zmiňuje rostoucí význam automatizace a digitalizace v kultivaci kmenových buněk. Robotické systémy, umělá inteligence a monitorování v reálném čase výrazně zvyšují efektivitu, reprodukovatelnost a škálovatelnost buněčných kultur. Závěrečná část se zaměřila na postup přípravy iPSCs a z nich odvozených organoidů. Tyto modely představují významný nástroj pro studium patologií a testování nových léčiv, což přispívá k rozvoji personalizované medicíny.

I přes přetrvávající výzvy, jako je optimalizace protokolů, zajištění dlouhodobé stability buněčných kultur a snížení nákladů, je zřejmé, že zmíněné trendy představují významný pokrok a pravděpodobně jednu z nejslibnějších cest k rozvoji regenerativní medicíny. Kmenové buňky navíc otevírají možnosti léčby onemocnění, pro která zatím neexistuje účinná léčba nebo je dostupnost léčiv omezená.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):329-337. doi:10.18388/abp.2015_1023
2. Sumbalova Koledova Z. 3D cell culture: techniques for and beyond organoid applications. *Methods Mol Biol.* 2024;2764:1-12. doi:10.1007/978-1-0716-3674-9_1
3. Smith LA, Hidalgo Aguilar A, Owens DDG, et al. Using advanced cell culture techniques to differentiate pluripotent stem cells and recreate tissue structures representative of teratoma xenografts. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:667246. doi:10.3389/fcell.2021.667246
4. Luo L, Liu L, Ding Y, Dong Y, Ma M. Advances in biomimetic hydrogels for organoid culture. *Chem Commun (Camb).* 2023;59(64):9675-9686. doi:10.1039/d3cc01274c
5. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell.* 2016;165(7):1586-1597. doi:10.1016/j.cell.2016.05.082
6. Gan Z, Qin X, Liu H, Liu J, Qin J. Recent advances in defined hydrogels in organoid research. *Bioact Mater.* 2023;28:386–401. doi:10.1016/j.bioactmat.2023.06.004
7. Unal AZ, West JL. Synthetic ECM: Bioactive synthetic hydrogels for 3D tissue engineering. *Bioconjug Chem.* 2020;31(10):2253–2464. doi:10.1021/acs.bioconjchem.0c00270
8. Huang H, Bader TN, Jin S. Signaling molecules regulating pancreatic endocrine development from pluripotent stem cell differentiation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5867. doi:10.3390/ijms21165867
9. Dou Y, Pizarro T, Zhou L. Organoids as a model system for studying Notch signaling in intestinal epithelial homeostasis and intestinal cancer. *Am J Pathol.* 2022;192(10):1347-1357. doi:10.1016/j.ajpath.2022.06.008
10. Ho TC, Chang CC, Chan HP, et al. Hydrogels: properties and applications in biomedicine. *Molecules.* 2022;27(9):2902. doi:10.3390/molecules27092902
11. Wu S, Xu R, Duan B, Jiang P. Three-dimensional hyaluronic acid hydrogel-based models for in vitro human iPSC-derived NPC culture and differentiation. *J Mater Chem B.* 2017;5(21):3870-3878. doi:10.1039/C7TB00721C
12. Prasad M, Kumar R, Buragohain L, Kumari A, Ghosh M. Organoid technology: a reliable developmental biology tool for organ-specific nanotoxicity evaluation. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:696668. doi:10.3389/fcell.2021.696668
13. Chen HI, Song H, Ming GL. Applications of human brain organoids to clinical problems. *Dev Dyn.* 2019;248(1):53-64. doi:10.1002/dvdy.24662
14. Qian X, Song H, Ming GL. Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development.* 2019;146(8):dev166074. doi:10.1242/dev.166074

15. Rodrigues CAV, Fernandes TG, Diogo MM, da Silva CL, Cabral JMS. Stem cell cultivation in bioreactors. *Biotechnol Adv.* 2011;29(6):815-829. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.009
16. Mousaei Ghasroldasht M, Seok J, Park HS, Liakath Ali FB, Al-Hendy A. Stem cell therapy: from idea to clinical practice. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2850. doi:10.3390/ijms23052850
17. Woon MT, Pandey PR, Friedrich Ben-Nun I. Expansion of human pluripotent stem cells in stirred tank bioreactors. *Methods Mol Biol.* 2022;2436:39-53. doi:10.1007/7651_2021_396
18. Badenes SM, Fernandes TG, Cordeiro CSM, et al. Defined Essential 8™ medium and vitronectin efficiently support scalable xeno-free expansion of human induced pluripotent stem cells in stirred microcarrier culture systems. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151264. doi:10.1371/journal.pone.0151264
19. Galvanauskas V, Grincas V, Simutis R, Kagawa Y, Kino-oka M. Current state and perspectives in modeling and control of human pluripotent stem cell expansion processes in stirred-tank bioreactors. *Biotechnol Prog.* 2016;33(2):355-364. doi:10.1002/btpr.2431
20. Junne S, Neubauer P. How scalable and suitable are single-use bioreactors? *Curr Opin Biotechnol.* 2018;53:240-247. doi:10.1016/j.copbio.2018.04.003
21. Egger D, Tripisciano C, Weber V, Dominici M, Kasper C. Dynamic cultivation of mesenchymal stem cell aggregates. *Bioengineering (Basel).* 2018;5(2):48. doi:10.3390/bioengineering5020048
22. Kropp C, Massai D, Zweigerdt R. Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells. *Process Biochemistry.* 2017;59:244-254. doi:10.1016/j.procbio.2016.09.032
23. Tsai AC, Pacak CA. Bioprocessing of human mesenchymal stem cells: from planar culture to microcarrier-based bioreactors. *Bioengineering (Basel).* 2021;8(7):96. doi:10.3390/bioengineering8070096
24. Goldberg M, Buzoglu HD, Burus A, Bayazit Y. Stem cell and oxidative stress-inflammation cycle. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2022;18(5). doi:10.2174/1574888x17666221012151425
25. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 2009;324(5935):1673–1677. doi:10.1126/science.1171643
26. Peng H, Zhao M, Liu X, et al. Biomimetic materials to fabricate artificial cells. *Chem Rev.* 2024;124(23):13178–13215. doi:10.1021/acs.chemrev.4c00241
27. Montalbano G, Fiorilli S, Caneschi A, Vitale-Brovarone C. Type I collagen and strontium-containing mesoporous glass particles as hybrid material for 3D printing of bone-like materials. *Materials (Basel).* 2018;11(5):700. doi:10.3390/ma11050700
28. Inzana JA, Olvera D, Fuller SM, et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. *Biomaterials.* 2014;35(13):4026-4034. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.064

29. Jiang S, Wang M, He J. A review of biomimetic scaffolds for bone regeneration: Toward a cell-free strategy. *Bioeng Transl Med*. 2020;6(2):e10206. doi:10.1002/btm2.10206
30. Maumus M, Rozier P, Boulestreau J, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Opportunities and Challenges for Clinical Translation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:997. doi:10.3389/fbioe.2020.00997
31. Mekuye B, Abera B. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Select*. 2023;4(8). doi:10.1002/nano.202300038
32. Bhattacharya T, Soares GABE, Chopra H, et al. Applications of phyto-nanotechnology for the treatment of neurodegenerative disorders. *Materials (Basel)*. 2022;15(3):804. doi:10.3390/ma15030804
33. Thamarai P, Karishma S, Kamalesh R, et al. Current advancements in nanotechnology for stem cells. *Int J Surg*. 2024;110(12):7456-7476. doi:10.1097/JS9.0000000000002082
34. Gidwani B, Sahu V, Shukla SS, et al. Quantum dots: Prospectives, toxicity, advances and applications. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2021;61:102308. doi:10.1016/j.jddst.2020.102308
35. Yang X, Li Y, Liu X, He W, Huang Q, Feng Q. Nanoparticles and their effects on differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomater Transl*. 2020;1(1):58-68. doi:10.3877/cma.j.issn.2096-112X.2020.01.006
36. Hicks MR, Pyle AD. The emergence of the stem cell niche. *Trends Cell Biol*. 2023;33(2):112-123. doi:10.1016/j.tcb.2022.07.003
37. Halim A, Qu KY, Zhang XF, Huang NP. Recent advances in the application of two-dimensional nanomaterials for neural tissue engineering and regeneration. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(8):3503-3529. doi:10.1021/acsbiomaterials.1c00490
38. Fatani WK, Aleanizy FS, Alqahtani FY, et al. Erlotinib-loaded dendrimer nanocomposites as a targeted lung cancer chemotherapy. *Molecules*. 2023;28(9):3974. doi:10.3390/molecules28093974
39. Hendriks D, Clevers H, Artegiani B. CRISPR-Cas tools and their application in genetic engineering of human stem cells and organoids. *Cell Stem Cell*. 2020;27(5):705-731. doi:10.1016/j.stem.2020.10.014
40. Lotfi M, Morshedi Rad D, Mashhadi SS, et al. Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery approaches for therapeutic gene editing of stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2023;19(8):2576-2596. doi:10.1007/s12015-023-10585-3
41. De Masi C, Spitalieri P, Murdocca M, Novelli G, Sangiuolo F. Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: from gene editing to drug discovery. *Hum Genomics*. 2020;14(1):25. doi:10.1186/s40246-020-00276-2
42. Chiacchiera F, Morey L, Mozzetta C. Editorial: Epigenetic Regulation of Stem Cell Plasticity in Tissue Regeneration and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:82. doi:10.3389/fcell.2020.00082

43. Völker-Albert M, Bronkhorst A, Holdenrieder S, Imhof A. Histone Modifications in Stem Cell Development and Their Clinical Implications. *Stem Cell Reports*. 2020;15(6):1196-1205. doi:10.1016/j.stemcr.2020.11.002
44. Altun G, Loring JF, Laurent LC. DNA methylation in embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. 2010;109(1):1-6. doi:10.1002/jcb.22374
45. Nießing B, Breitzkreuz Y, Elanzew A, et al. Automated CRISPR/Cas9-based genome editing of human pluripotent stem cells using the StemCellFactory. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024;12:1459273. doi:10.3389/fbioe.2024.1459273
46. Shariatzadeh M, Chandra A, Wilson SL, et al. Distributed automated manufacturing of pluripotent stem cell products. *Int J Adv Manuf Technol*. 2020;106(3):1085-1103. doi:10.1007/s00170-019-04516-1
47. Kanda GN, Tsuzuki T, Terada M, et al. Robotic search for optimal cell culture in regenerative medicine. *Elife*. 2022;11:e77007. doi:10.7554/eLife.77007
48. Ge JY, Wang Y, Li QL, Liu FK, Lei QK, Zheng YW. Trends and challenges in organoid modeling and expansion with pluripotent stem cells and somatic tissue. *PeerJ*. 2024;12:e18422. doi:10.7717/peerj.18422
49. Tristan CA, Ormanoglu P, Slamecka J, et al. Robotic high-throughput biomanufacturing and functional differentiation of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2021;16(12):3076-3092. doi:10.1016/j.stemcr.2021.11.004
50. Boussaad I, Cruciani G, Bolognin S, et al. Integrated, automated maintenance, expansion and differentiation of 2D and 3D patient-derived cellular models for high throughput drug screening. *Sci Rep*. 2021;11(1):1439. doi:10.1038/s41598-021-81129-3
51. Ohta A, Kawai S, Pretemer Y, et al. Automated cell culture system for the production of cell aggregates with growth plate-like structure from induced pluripotent stem cells. *SLAS Technol*. 2023;28(6):433-441. doi:10.1016/j.slant.2023.08.002
52. Ma Z, Toledo MAS, Wanek P, et al. Cell cluster sorting in automated differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells towards blood cells. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:755983. doi:10.3389/fbioe.2022.755983
53. Shi H, Kowalczewski A, Vu D, et al. Organoid intelligence: Integration of organoid technology and artificial intelligence in the new era of in vitro models. *Med Nov Technol Devices*. 2024;21:100276. doi:10.1016/j.medntd.2023.100276
54. Webb S. Deep learning for biology. *Nature*. 2018;554(7693):555-557. doi:10.1038/d41586-018-02174-z
55. Powell KA, Bohrer LR, Stone NE, et al. Automated human induced pluripotent stem cell colony segmentation for use in cell culture automation applications. *SLAS Technol*. 2023;28(6):416-422. doi:10.1016/j.slant.2023.07.004
56. Kim W, Park E, Yoo HS, Park J, Jung YM, Park JH. Recent advances in monitoring stem cell status and differentiation using nano-biosensing technologies. *Nanomaterials*. 2022;12(17):2934. doi:10.3390/nano12172934

57. Lee J, Kim H, Lim HR, et al. Large-scale smart bioreactor with fully integrated wireless multivariate sensors and electronics for long-term in situ monitoring of stem cell culture. *Sci Adv.* 2024;10(7):eadk6714. doi:10.1126/sciadv.adk6714
58. Hassan Q, Ahmadi S, Kerman K. Recent advances in monitoring cell behavior using cell-based impedance spectroscopy. *Micromachines (Basel).* 2020;11(6):590. doi:10.3390/mi11060590
59. Doulgkeroglou MN, Di Nubila A, Niessing B, et al. Automation, monitoring, and standardization of cell product manufacturing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:811. doi:10.3389/fbioe.2020.00811
60. Pisetsky DS. The basic and translational science year in review: Confucius in the era of Big Data. *Semin Arthritis Rheum.* 2020;50(3):373-379. doi:10.1016/j.semarthrit.2020.02.010
61. Nehme R, Barrett LE. Using human pluripotent stem cell models to study autism in the era of big data. *Mol Autism.* 2020;11(1):21. doi:10.1186/s13229-020-00322-9
62. Ye L, Swingen C, Zhang J. Induced pluripotent stem cells and their potential for basic and clinical sciences. *Curr Cardiol Rev.* 2013;9(1):63-72. doi:10.2174/157340313805076278
63. Ohnuki M, Takahashi K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1680):20140367. doi:10.1098/rstb.2014.0367
64. Karami Z, Moradi S, Eidi A, Soleimani M, Jafarian A. Induced pluripotent stem cells: Generation methods and a new perspective in COVID-19 research. *Front Cell Dev Biol.* 2023;10:1050856. doi:10.3389/fcell.2022.1050856
65. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep.* 2020;16(1):3-32. doi:10.1007/s12015-019-09935-x
66. Cerneckis J, Cai H, Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduct Target Ther.* 2024;9(1):112. doi:10.1038/s41392-024-01809-0
67. Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell.* 2012;10(6):678-684. doi:10.1016/j.stem.2012.05.005
68. Panda A, Gurusamy N, Rajasingh S, Carter HK, Thomas EL, Rajasingh J. Non-viral reprogramming and induced pluripotent stem cells for cardiovascular therapy. *Differentiation.* 2020;112:58-66. doi:10.1016/j.diff.2019.12.001
69. Wang J, Sun S, Deng H. Chemical reprogramming for cell fate manipulation: Methods, applications, and perspectives. *Cell Stem Cell.* 2023;30(9):1130-1147. doi:10.1016/j.stem.2023.08.001
70. Liuyang S, Wang G, Wang Y, et al. Highly efficient and rapid generation of human pluripotent stem cells by chemical reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2023;30(4):450-459.e9. doi:10.1016/j.stem.2023.02.008

71. Hochedlinger K, Jaenisch R. Induced Pluripotency and Epigenetic Reprogramming. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12):a019448. doi:10.1101/cshperspect.a019448
72. Li Y, Darabi R. Role of epigenetics in cellular reprogramming; from iPSCs to disease modeling and cell therapy. *J Cell Biochem.* 2022;123(2):147-154. doi:10.1002/jcb.30164
73. Barrachina L, Arshaghi TE, O'Brien A, Ivanovska A, Barry F. Induced pluripotent stem cells in companion animals: how can we move the field forward? *Front Vet Sci.* 2023;10:1176772. doi:10.3389/fvets.2023.1176772
74. Gao L, Wang F, Wang Y, Hu L, Mao J. A protocol for the generation of patient-specific iPSC lines from peripheral blood mononuclear cells. *STAR Protoc.* 2022;3(3):101530. doi:10.1016/j.xpro.2022.101530
75. Yin X, Cai Y, Jia N, Hui L, Zhu Z. Characterization of the human induced pluripotent stem cell (iPSC) SZGJMSi004-A line from a 28-year-old Han male patient with depression. *Stem Cell Research.* 2024;77:103428. doi:10.1016/j.scr.2024.103428
76. Cheng YS, Xu M, Chen G, et al. A Protocol for Culture and Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cells After Induction. *Curr Protoc.* 2023;3(8):e866. doi:10.1002/cpz1.866
77. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2014;9(10):2329-2340. doi:10.1038/nprot.2014.158
78. Qian X, Jacob F, Song MM, Nguyen HN, Song H, Ming GL. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nat Protoc.* 2018;13(3):565-580. doi:10.1038/nprot.2017.152
79. Hendriks D, Pagliaro A, Andreatta F, et al. Human fetal brain self-organizes into long-term expanding organoids. *Cell.* 2024;187(3):712-732.e38. doi:10.1016/j.cell.2023.12.012
80. McCauley HA, Wells JM. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development.* 2017;144(6):958-962. doi:10.1242/dev.140731
81. Tsuruta S, Uchida H, Akutsu H. Intestinal organoids generated from human pluripotent stem cells. *JMA J.* 2020;3(1):9-19. doi:10.31662/jmaj.2019-0027
82. Mithal A, Capilla A, Heinze D, et al. Generation of mesenchyme free intestinal organoids from human induced pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2020;11(1):215. doi:10.1038/s41467-019-13916-6
83. Broda TR, McCracken KW, Wells JM. Generation of human antral and fundic gastric organoids from pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2019;14(1):28-50. doi:10.1038/s41596-018-0080-z
84. Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2014;4:3594. doi:10.1038/srep03594

85. Koide T, Koyanagi-Aoi M, Uehara K, Kakeji Y, Aoi T. CDX2-induced intestinal metaplasia in human gastric organoids derived from induced pluripotent stem cells. *iScience*. 2022;25(5):104314. doi:10.1016/j.isci.2022.104314
86. Lee S, Choi JH, Park SY, Kim J. Gastric organoid, a promising modeling for gastric stem cell homeostasis and therapeutic application. *International Journal of Stem Cells*. 2024;17(4):337-346. doi:10.15283/ijsc23075
87. McCracken KW, Aihara E, Martin B, et al. Wnt/ β -catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans. *Nature*. 2017;541(7636):182-187. doi:10.1038/nature21021
88. Ozawa H, Matsumoto T, Nakagawa M. Culturing human pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*. 2023;23(6):479–489. doi:10.1080/14712598.2023.2225701
89. Deguchi K, Zambaiti E, De Coppi P. Regenerative medicine: current research and perspective in pediatric surgery. *Pediatr Surg Int*. 2023;39(1):167. doi:10.1007/s00383-023-05438-6
90. Takahashi J. Next steps in regenerative medicine. *Cell Stem Cell*. 2023;30(5):509–511. doi:10.1016/j.stem.2023.04.015
91. Tsujimoto H, Osafune K. Current status and future directions of clinical applications using iPS cells—focus on Japan. *FEBS J*. 2021;289(23):7194–7205. doi:10.1111/febs.16162
92. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous induced stem-cell–derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med*. 2017;376(11):1038–1046. doi:10.1056/NEJMoa1608368
93. Fujita J. Development of cardiac regenerative medicine using human iPS cell-derived cardiomyocytes. *Keio J Med*. 2021;70(3):53–59. doi:10.2302/kjm.2020-0009-ir
94. Miyagawa S, Kainuma S, Kawamura T, et al. Case report: transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte patches for ischemic cardiomyopathy. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:950829. doi:10.3389/fcvm.2022.950829
95. Penney J, Ralvenius WT, Tsai LH. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry*. 2020;25(1):148–167. doi:10.1038/s41380-019-0468-3
96. Brooks IR, Garrone CM, Kerins C, et al. Functional genomics and the future of iPSCs in disease modeling. *Stem Cell Reports*. 2022;17(5):1033–1047. doi:10.1016/j.stemcr.2022.03.019
97. Rauth S, Karmakar S, Batra SK, Ponnusamy MP. Recent advances in organoid development and applications in disease modeling. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021;1875(2):188527. doi:10.1016/j.bbcan.2021.188527
98. Marei HE, Khan MUA, Hasan A. Potential use of iPSCs for disease modeling, drug screening, and cell-based therapy for Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol Lett*. 2023;28(1):98. doi:10.1186/s11658-023-00504-2

99. Aboul-Soud MAM, Alzahrani AJ, Mahmoud A. Induced pluripotent stem cells (iPSCs)–roles in regenerative therapies, disease modelling and drug screening. *Cells*. 2021;10(9):2319. doi:10.3390/cells10092319
100. Okano H, Morimoto S. iPSC-based disease modeling and drug discovery in cardinal neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell*. 2022;29(2):189–208. doi:10.1016/j.stem.2022.01.007
101. Fanizza F, Campanile M, Forloni G, Giordano C, Albani D. Induced pluripotent stem cell-based organ-on-a-chip as personalized drug screening tools: a focus on neurodegenerative disorders. *J Tissue Eng*. 2022;13:20417314221095339. doi:10.1177/20417314221095339
102. Zhang T, Qian C, Song M, et al. Application prospect of induced pluripotent stem cells in organoids and cell therapy. *Int J Mol Sci*. 2024;25(5):2680. doi:10.3390/ijms25052680
103. Chang CY, Ting HC, Liu CA, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-based neurodegenerative disease models for phenotype recapitulation and drug screening. *Molecules*. 2020;25(8):2000. doi:10.3390/molecules25082000
104. Chang CY, Chen SM, Lu HE, et al. N-butylidenephthalide attenuates Alzheimer's disease-like cytopathy in Down syndrome induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Sci Rep*. 2015;5:8744. doi:10.1038/srep08744
105. Lee SW, Song M, Woo DH, Jeong GS. Proposal for considerations during human iPSC-derived cardiac organoid generation for cardiotoxicity drug testing. *Biomed Pharmacother*. 2024;174:116511. doi:10.1016/j.biopha.2024.116511
106. Yin X, Li Q, Shu Y, et al. Exploiting urine-derived induced pluripotent stem cells for advancing precision medicine in cell therapy, disease modeling, and drug testing. *J Biomed Sci*. 2024;31(1):47. doi:10.1186/s12929-024-01035-4