

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY JATERNÍCH SFÉROIDŮ

TEREZA VOJTĚCHOVÁ

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. IVA BOUŠOVÁ, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. MARTIN AMBROŽ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za ochotnou pomoc, rady, trpělivost a vedení při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat za pomoc a trpělivost při praktickém zpracování PharmDr. Martinu Ambrožovi, Ph.D. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu během celého mého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 5. 9. 2022

Tereza Vojtěchová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Tereza Vojtěchová

Školitel: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martin Ambrož, Ph.D.

Název diplomové práce: Optimalizace přípravy jaterních sféroidů

V preklinickém hodnocení léčiv hrají nezastupitelnou roli různé jaterní *in vitro* modely. Jedním z nich jsou multiceulární jaterní sféroidy. Jedná se o 3D buněčné agregáty, které vznikají procesem buněčné agregace. Jsou využívány ve vývoji léčiv a představují slibný nástroj pro identifikaci nových cílů a screening léčiv na různá jaterní onemocnění. Cílem této diplomové práce bylo zavést a optimalizovat přípravu jaterních sféroidů metodou „*forced-floating*“. Pro izolaci hepatocytů a přípravu sféroidů byly použity játra samců a samic potkana kmene Wistar. Při izolaci hepatocytů jsme čelili problémům s jejich nízkou viabilitou, proto jsme se postup izolace snažili optimalizovat. Přesto se nám podařilo získat pouze malé množství hepatocytů s dostatečnou viabilitou k následnému vytvoření sféroidů. Vytvořené sféroidy jsme inkubovali po dobu 7 a 14 dnů s různými lipogenními činidly a sledovali jsme jejich viabilitu pomocí měření produkce adenosintrifosfátu (ATP). Při inkubaci sféroidů s lipogenními substráty po dobu 7 dnů nedošlo k zásadním změnám v hladinách ATP, zatímco při inkubaci sféroidů po dobu 14 dnů došlo vlivem amiodaronu samotného a kombinace lipogenních substrátů s insulinem k signifikantnímu poklesu jejich viability. Jako marker syntetické aktivity sféroidů jsme použili albumin. Pomocí metody dot blot jsme zjistili, že námi vytvořené sféroidy jsou schopny syntetizovat albumin a vylučovat ho do kultivačního média. Dále jsme ověřovali schopnost sféroidů exprimovat vybrané geny kódující biotransformační enzymy (cytochrom P450 1/2, 3A, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1). Z výsledků je patrné, že přestože jejich exprese kolísala, nedošlo v průběhu inkubace k signifikantní změně v expresi mRNA.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Tereza Vojtěchová

Supervisor: assoc. prof. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Advisor: PharmDr. Martin Ambrož, Ph.D.

Title of diploma thesis: Optimization of liver spheroids preparation

Various *in vitro* liver models play an irreplaceable role in preclinical drug evaluation. One of them is multicellular hepatic spheroids. These are 3D cell aggregates that are formed by the process of cellular aggregation. They are used in drug development and represent a promising tool for identifying new targets and drug screening for various liver diseases. The aim of this thesis was to introduce and optimize the preparation of liver spheroids by the „*forced-floating*“ method. The liver of male and female Wistar rats was used for hepatocyte isolation and spheroid preparation. Due to the low viability of isolated hepatocytes, we tried to optimize the isolation procedure. Nevertheless, we managed to obtain only a small number of hepatocytes with sufficient viability for subsequent formation of spheroids. The spheroids were incubated with various lipogenic reagents for 7 and 14 days and their viability was monitored by measuring adenosine triphosphate (ATP) production. Incubation of spheroids with lipogenic substrates for 7 days did not result in significant changes in ATP levels, while incubation of spheroids with the amiodarone alone and a combination of lipogenic substrates with insulin for 14 days resulted in a significant decrease in their viability. Albumin was used as a marker of the synthetic activity of spheroids. Using the dot blot method, we found out that the spheroids were able to synthesize albumin and secrete it into the culture medium. We also verified the ability of spheroids to express selected genes encoding biotransformation enzymes (cytochrome P450 1/2, 3A, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1). The results show that although their expression fluctuated, there was no significant change in mRNA expression during incubation.

OBSAH

1. ÚVOD.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Játra	10
2.1.1 Funkce jater	10
2.1.2 Anatomie jater	10
2.2 Jaterní buňky	12
2.2.1 Hepatocyty	13
2.2.2 Neparenchymální buňky	14
2.2.2.1 Kupfferovy buňky	14
2.2.2.2 Endotelové buňky.....	15
2.2.2.3 Cholangiocyty	15
2.2.2.4 Itovy buňky	15
2.2.2.5 Pit buňky	15
2.2.2.6 Jaterní progenitorové buňky (oválné buňky)	16
2.3 Jaterní <i>in vitro</i> modelové systémy.....	16
2.3.1 Subcelulární frakce.....	17
2.3.2 Kultivace izolovaných hepatocytů	17
2.3.3 Buněčné linie odvozené z karcinomu jater	20
2.3.4 Trojrozměrné <i>in vitro</i> modely	21
2.3.4.1 Jaterní sféroidy	21
2.3.4.2 Ultratenké jaterní řezy.....	22
2.3.5 Model perfundovaných jater	22
2.4 Izolace hepatocytů.....	23
2.4.1 Jednostupňová kolagenasová perfúze	25
2.4.2 Dvoustupňová kolagenasová perfúze.....	25
2.4.3 Faktory ovlivňující účinnost izolace hepatocytů.....	25
2.5 Multicelulární sféroidy	26
2.5.1 Molekulární mechanismy tvorby sféroidů	27
2.5.2 Kultivace sféroidů	28
2.5.2.1 Metoda visící kapky	28

2.5.2.2	Metoda „forced-floating“	29
2.5.2.3	Metody založené na míchání.....	30
2.5.2.4	Technika mikrofluidní kultury	31
2.5.2.5	Magnetická levitace	32
2.5.2.6	Biomateriály	32
3.	CÍL PRÁCE	35
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1	Přístroje, chemikálie a roztoky, materiál a pomůcky	36
4.2	Metody	38
4.2.1	Izolace hepatocytů a tvorba jaterních sféroidů.....	38
4.2.1.1	Příprava roztoků na izolaci hepatocytů.....	38
4.2.1.2	Izolace hepatocytů.....	39
4.2.1.3	Příprava a práce se sféroidy	40
4.2.2	Stanovení viability sféroidů pomocí měření hladiny ATP.....	41
4.2.3	Stanovení proteinové exprese metodou dot blot	43
4.2.3.1	Detekce proteinů	43
4.2.4	Stanovení exprese mRNA	44
4.2.4.1	Izolace RNA TRIzolom.....	44
4.2.4.2	Měření koncentrace a čistoty RNA	44
4.2.4.3	Ošetření vzorků DNAsou	45
4.2.4.4	Reverzní transkripce.....	45
4.2.4.5	Real-time PCR (qPCR, kvantitativní PCR v reálném čase).....	46
4.2.5	Statistické hodnocení dat.....	48
5.	VÝSLEDKY	49
5.1	Izolace hepatocytů.....	49
5.2	Určení viability sféroidů pomocí měření ATP.....	50
5.3	Ověření syntetické funkce jaterních sféroidů.....	54
5.4	Expese mRNA v jaterních sféroidech.....	55
6.	DISKUSE	58
7.	ZÁVĚR.....	62

8. POUŽITÉ ZKRATKY.....	63
9. SEZNAM TABULEK.....	65
10. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	66
11. POUŽITÁ LITERATURA.....	67

1. ÚVOD

Játra jsou ústředním orgánem intermediárního metabolismu a také hrají klíčovou roli při odstraňování léčiv a toxických látek z těla. Játra jsou vysoce náchylná k akumulaci léčiv a souvisejícímu lékovému poškození. K ověření bezpečnosti jakéhokoli xenobiotika pro člověka je nezbytné mimořádně přísné testování. Historicky byly první volbou pro testování toxicity zvířecí modely, počty zvířat ve výzkumu dosahovaly astronomických hodnot. Ve snaze snížit počet pokusných zvířat a vytvořit koncept humánního zacházení se zvířaty, byly v roce 1959 navrženy principy 3R (*Replacement, Reduction, Refinement* – nahrazení, snížení počtu, zmírnění), což podpořilo snahy o tvorbu a použití alternativních modelů ve výzkumu (Hubrecht & Carter, 2019).

V rámci preklinického a klinického hodnocení léčiv mají v současnosti nezastupitelnou roli různé jaterní *in vitro* modely. Příkladem těchto *in vitro* systémů jsou subcelulární frakce, primární kultury hepatocytů, imortalizované jaterní buněčné linie, ultratenké jaterní řezy nebo perfundovaná játra. Zmíněné buněčné modely je možné kultivovat v monovrstvě (2D model) nebo jako model s 3D strukturou (např. sféroidy). Tyto modely je možné využít pro stanovení hepatoprotektivní kapacity látek a screening cytotoxických a genotoxických sloučenin (Guillouzo, 1998; Kučera et al., 2006; Segovia-Zafra et al., 2021).

Cílem této diplomové práce bylo zavést a optimalizovat metodu přípravy potkaních jaterních sféroidů. Jaterní sféroidy jsou kulovité mnohobuněčné agregáty o velikosti kolem 100 μm , které tvoří jednoduché trojrozměrné systémy (Lin & Chang, 2008). Sféroidy vznikají procesem buněčné agregace. Jejich tvorba bývá velmi rychlá a relativně levná a lze je připravit ve velkém množství. Sféroidy mají široké využití v onkologickém výzkumu, terapeutické transplantaci, screeningu léků a klinickém studiu. Existují různé metody tvorby sféroidů, jako jsou metoda visící kapky, metoda „*forced-floating*“, metody založené na míchání, mikrofluidní kultivační techniky a metoda magnetické levitace (Page et al., 2012; Ryu et al., 2019). V této diplomové práci byla pro přípravu jaterních sféroidů použita metoda „*forced-floating*“ za použití kultivačních destiček s velmi nízkou adhezivitou.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Játra

Játra (hepar) jsou největší žlázou v lidském těle, která vykazuje jak endokrinní, tak exokrinní vlastnosti. Jednou z endokrinních funkcí je např. sekrece několika hormonů, jako jsou inzulínu podobné růstové faktory, angiotenzin a trombopoetin, zatímco hlavní exokrinní funkcí je sekrece žluči (Si-Tayeb et al., 2010).

2.1.1 Funkce jater

Játra jsou důležitým lidským orgánem, který vykonává mnoho životně důležitých funkcí. Patří mezi ně odstraňování odpadních produktů a cizích látek z krevního oběhu, regulace hladiny cukru v krvi nebo tvorba základních živin.

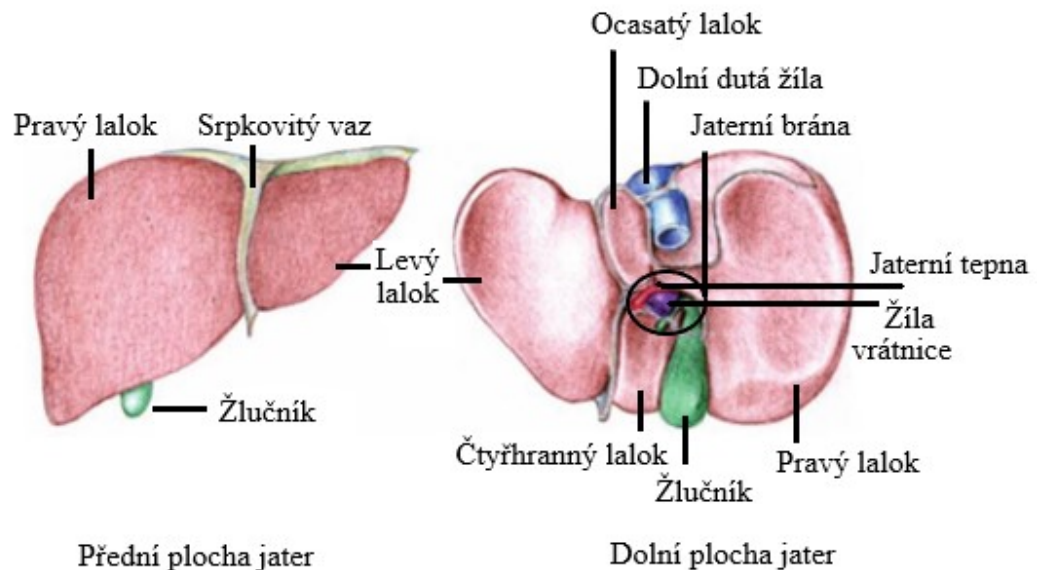
Jaterní buňky jsou zodpovědné za syntézu celé řady bílkovin, které v organismu vykonávají mnoho funkcí, včetně hemokoagulace a albuminu. Játra jsou také zodpovědná za syntézu cholesterolu, triacylglycerolů a fosfolipidů. Stejně tak sacharidy jsou produkovány v játrech, kde také dochází k přeměně glukózy na glykogen. Další funkcí je produkce žluči, která pomáhá při trávení potravy. Důležitou roli hrají játra při detoxikaci organismu tím, že přeměňují toxický amoniak, vedlejší produkt metabolismu v těle, na netoxickou močovinu, která je pak vylučována močí. Játra také biotransformují léčiva, alkohol a jsou rovněž zodpovědná za rozklad inzulínu a dalších hormonů organismu (Wedro, 2020).

2.1.2 Anatomie jater

Játra jsou největším parenchymovým orgánem v lidském těle. U dospělého muže bývá váha kolem 1500–1800 g, u ženy to je přibližně 1200–1500 g. Představují tak přibližně 3 % tělesné hmotnosti. Svým tvarem mohou připomínat trojboký jehlan položený na bok, jehož základna je přiložená k pravé břišní stěně a vrchol směřuje k levé břišní stěně (Ehrmann & Hůlek, 2010).

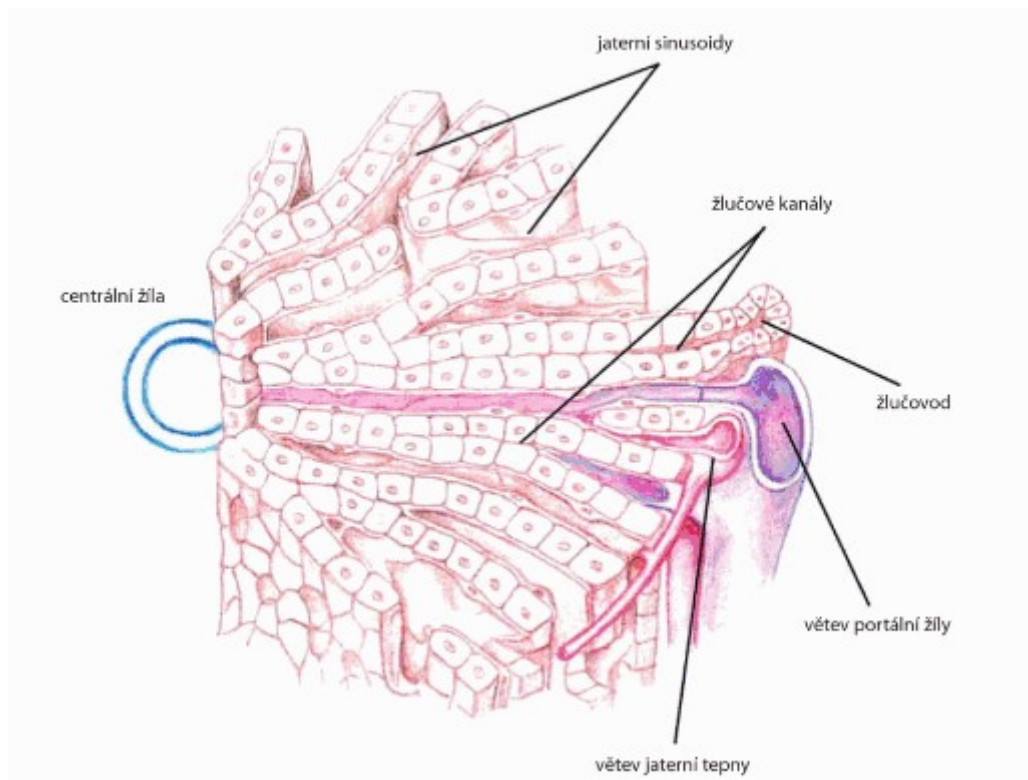
Zevní anatomii můžeme pozorovat na **obr.1**. Horní přední plochou játra naléhají na horní a přední část bránice. Na povrchu jater se nachází *ligamentum falciforme*, které rozděluje játra na pravý a levý lalok. Spodní plocha jater naléhá na orgány dutiny břišní. Jaterní bránou (*porta hepatis*) vstupují do jater jaterní tepna a vrátnicová žíla, tudíž také

vystupují žlučové cesty. Kromě pravého a levého laloku, rozlišujeme také u jater lalok ocasatý (*lobus caudatus*), jenž je ohraničen zprava dolní žílou a zleva *ligamentum venosum*, a lalok čtyřhranný (*lobus quadratus*), který je ohraničen zprava žlučníkem a zleva *ligamentum teres*. V kontaktu s ostatními stěnami tvoří dolní plocha zřetelnou hranu, hmatatelnou při fyzikálním vyšetření, kterou v přední části nazýváme jaterní okraj (Ehrmann & Hůlek, 2010).



Obrázek 1 Játra - zevní pohled z přední a dolní strany (upraveno z (Ehrmann & Hůlek, 2010))

Základní funkční jednotkou jater je jaterní lalůček (**obr. 2**) - lobulus o délce několika milimetrů a průměru 0,8–2mm. Je umístěný kolem centrální žíly (*vena centralis*) a skládá se z jaterních buněk, hepatocytů, které jsou poskládány do dvouvrstevných trámců (plotének). V septech mezi sousedními lalůčky se nacházejí žlučovody, do kterých ústí žlučové kanálky nacházející se mezi sousedními buňkami (Ehrmann & Hůlek, 2010; Horký & Čech, 2014).

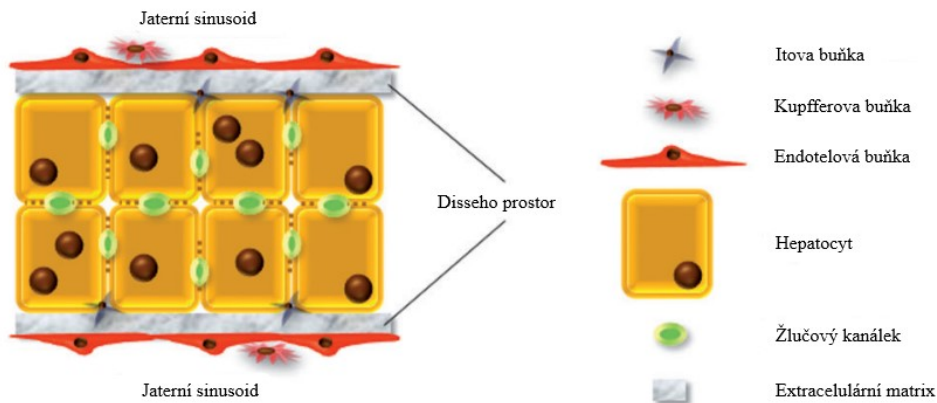


Obrázek 2 Schéma jaterního lalůčku (převzato z (Ehrmann & Hůlek, 2010))

Dále se v jaterním lalůčku nachází tzv. jaterní sinusoidy, které probíhají mezi trámci hepatocytů a ústí do centrální žíly. Mezi trámci a stěnou sinusoidů se nachází tzv. Disseho prostor, úzký perisinusoidální prostor, kam jaterní buňky vysílají dlouhé mikrokilky. Stěnu sinusoid tvoří endotelové buňky, mezi které se vkládají Kupfferovy buňky (Horký & Čech, 2014).

2.2 Jaterní buňky

Jaterní tkáň je složena převážně z parenchymálních buněk (hepatocyty), které tvoří až 78% objemu jater. Kromě hepatocytů existují také jiné typy jaterních buněk a to buňky neparenchymální (**obr. 3**), zahrnující Kupfferovy buňky, endotelové buňky, cholangiocyty, Itovy buňky, Pit buňky a jaterní progenitorové buňky (Ishibashi & Nakamura, 2009).

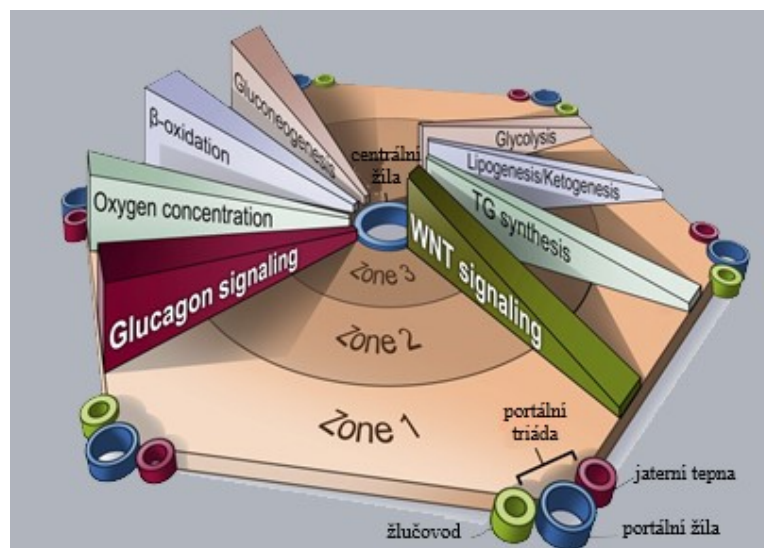


Obrázek 3 Schéma tkáňové architektury v jaterní sinusoidě (upraveno z (Zeilinger et al., 2016))

2.2.1 Hepatocyty

Termínem „hepatocyty“ se označují parenchymální jaterní buňky, které vykazují celou řadu exkretčních, metabolických a detoxikačních funkcí nezbytných pro udržení života (Si-Tayeb et al., 2010). Jedná se o buňky polygonálního tvaru, o velikosti přibližně 25–30 μm , s bohatou cytoplazmou a jedním, příp. dvěma kulatými jádry. Díky vysoké metabolické aktivitě mají jaterní buňky mnoho organel. Obsahují velké množství mitochondrií, objemný Golgiho aparát, hojné profily hladkého a drsného endoplazmatického retikula, lyzosomy a peroxisomy. Mezi dvěma hepatocyty vždy probíhají žlučové kanálky o průměru 1 - 2 μm (Horký & Čech, 2014).

Hepatocyty plní většinu specializovaných funkcí jater, včetně metabolismu lipidů, detoxikace exogenních xenobiotik a produkce plazmatických proteinů důležitých pro krevní srážení (Baker et al., 2001). Dále jsou hepatocyty schopny ukládat některé vitamíny (D, B₁₂) a ukládat železo ve formě feritinu (Horký & Čech, 2014). V hepatocytech také vzniká většina bílkovin podílejících se na jaterní homeostáze a jejich množství je primárně regulováno na úrovni transkripce (Baker et al., 2001). Jaterní tkáň je značně funkčně heterogenní, co se týče míry zapojení jednotlivých hepatocytů do specifických biochemických drah. Soubor anabolických a katabolických reakcí, které v jednotlivých hepatocytech probíhají, není náhodný, ale závisí pravděpodobně na poloze hepatocytu v jaterním lalůčku (Kusminski & Scherer, 2018). Zonace různých biochemických drah v jaterním lalůčku je znázorněna na **obr. 4**.



Obrázek 4 Rozdělení biochemických drah v játrech do zón (upraveno z (Kusminski & Scherer, 2018))

Další charakteristikou hepatocytů je schopnost regenerace. V případě chirurgického vynětí části jater nebo působení hepatotoxických látek dochází v krátké době k doplnění jaterního parenchymu dělením zbylých hepatocytů (Horký & Čech, 2014). Dlouhodobé působení toxických látek vede k selhání jater, ke kterému může dojít náhle (akutní selhání jater) nebo postupně v průběhu měsíců či let následujících po nástupu progresivního onemocnění jater (chronické selhání jater) (Gupta & Kumaran, 2004). Hepatocyty také aktivují vrozenou imunitu proti invazivním mikroorganismům tím, že vylučují proteiny vrozené imunity. Mezi tyto proteiny patří baktericidní proteiny, které přímo zabíjejí bakterie, opsoniny, které pomáhají při fagocytóze cizích bakterií, proteiny sekvestrující železo, které blokují vychytávání železa bakteriemi a koagulační faktor fibrinogen, který aktivuje vrozenou imunitu (Zhou et al., 2016).

2.2.2 Neparenchymální buňky

2.2.2.1 Kupfferovy buňky

Kupfferovy buňky jsou v podstatě jaterní makrofágy, které jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému a sídlí v sinusové sliznici, i když mohou sahat do Disseho prostoru. Tyto buňky také interagují s ostatními buňkami jater, zejména s hvězdicovitými a endotelovými buňkami (Potter, 2018). Mezi funkce těchto buněk

patří fagocytóza velkých částic, včetně odumírajících erytrocytů či zbytků rozpadlých buněk nebo sekrece cytokinů a proteas (Si-Tayeb et al., 2010).

2.2.2.2 Endotelové buňky

Endotelové buňky tvoří asi 50 % celkového množství neparenchymálních buněk v játrech. I když mají některé rysy společné s cévními endotelovými buňkami, na rozdíl od nich nemají pravou bazální membránu a obsahují velké množství fenestrací, což je činí nejprůchodnějšími ze všech endotelových buněk savců (LeCluyse et al., 2018). Tyto buňky vychytávají modifikované lipoproteiny (hlavně HDL a LDL), transferin či ceruloplazmin a také jsou schopny endocytózy (Ehrmann & Hůlek, 2010).

2.2.2.3 Cholangiocyty

Cholangiocyty jsou epitelové buňky žlučových cest. Tvoří cca 3 % buněčné populace jater. Jejich funkcí je např. kontrola pH žluči, kontrola průtoku žluči nebo vylučování vody a hydrogenuhličitanů (Maroni et al., 2015; Si-Tayeb et al., 2010).

2.2.2.4 Itovy buňky

Itovy buňky, známe také jako stelátní buňky nebo hvězdicovité buňky, jsou umístěny v subendotelovém prostoru (Ehrmann & Hůlek, 2010). Obvykle jsou v těchto buňkách skladovány retinoidy (hlavně deriváty vitamínu A) ve formě kapiček lipidů, jejichž počet se liší podle fyziologických a patologických podmínek. Tyto buňky produkují několik typů kolagenu a laminin. Dále se také předpokládá, že se podílejí na vzniku fibrózy po poškození jater (Potter, 2018).

2.2.2.5 Pit buňky

Pit buňky jsou jedním z typů jaterních sinusoidních buněk. Jedná se o velké granulární lymfocyty, patřící do skupiny přirozených zabíječů (*natural killers*). Nachází se uvnitř jaterních sinusoid, adherují k endoteliálním a Kupfferovým buňkám. Jejich funkcí je ochrana proti virovým infekcím a metastatickým nádorovým buňkám (Ehrmann & Hůlek, 2010; Nakatani et al., 2004).

2.2.2.6 Jaterní progenitorové buňky (oválné buňky)

Jaterní progenitorové buňky (hepatic progenitor cells), jak se nazývají u lidí a myši, nebo oválné buňky u potkanů, představují heterogenní populaci buněk, které se aktivují za různých fyziologických podmínek. Jsou popsány jako malé oválné buňky s řídkou, lehce bazofilní cytoplazmou a bledě modře zbarvenými jádry a nacházejí se v Heringově kanálu (prostor ležící mezi terminální větví žlučového a první řadou přilehlých hepatocytů v periportální oblasti jater poblíž portální triády) (Kaur et al., 2015).

Tyto buňky vykazují značnou proliferační aktivitu a jsou schopny se diferencovat na buňky jaterní linie (např. hepatocyty a cholangiocyty) nebo různé epiteliální buňky (např. buňky střeva nebo pankreatu) (Sangan & Tosh, 2010). Buňky mohou být také zdrojem hepatocytů a to v případě, že dojde k takovému poškození jater, při němž hepatocyty ztrácejí svoji schopnost proliferace (Ehrmann & Hůlek, 2010).

2.3 Jaterní *in vitro* modelové systémy

V rámci preklinického vývoje léčiv se používá celá řada *in vitro* a *in vivo* modelů, které slouží k lepšímu pochopení mechanismů hepatotoxicity, k odstranění toxických sloučenin z farmaceutického portfolia látek a/nebo k navržení nových molekul, které by v konečném důsledku snížily počet pacientů, kteří klinické studie nedokončí např. z důvodu vedlejších účinků podávané látky (Segovia-Zafra et al., 2021). V minulosti byly k testování toxicity nově syntetizovaných látek používány pouze testy *in vivo*. Ekonomické, etické a také legislativní důvody vedly k hledání, rozvoji a využívání modelových *in vitro* systémů. Tyto systémy by měly být cenově dostupné, bezpečné a práce s nimi by neměla být tolik složitá (Kučera et al., 2006).

In vitro model je definován jako testovací systém, obvykle založený na buňkách, uspořádaný ve dvourozměrné (2D) nebo trojrozměrné (3D) konfiguraci, ve kterém jsou sledovány specifické výstupy nebo biomarkery. Mezi nejčastěji používané *in vitro* systémy patří subcelulární frakce, primární kultury hepatocytů, imortalizované jaterní buněčné linie (např. HepG2, HepaRG, Huh7), hepatocyty odvozené z kmenových buněk, hepatocyty ko-kultivované s jinými typy buněk, ultratenké jaterní řezy (PCLS) a model perfundovaných jater (Guillouzo, 1998). Zmíněné buněčné modely je možné kultivovat v monovrstvě (2D model) nebo jako model s 3D strukturou (např. sféroidy).

Dalšími používanými 3D modely jsou např. čipy (*liver-on-a-chip*) či 3D tištěná játra (*3D bioprint liver*) (Segovia-Zafra et al., 2021).

2.3.1 Subcelulární frakce

Subcelulární frakce zahrnují membránové vezikuly, mikrosomy, organely (např. jádra, mitochondrie, lysosomy, peroxisomy) a cytosolickou frakci. Příprava takovýchto frakcí je poměrně jednoduchá a provádí se diferenciální ultracentrifugací jaterního homogenitu. Subcelulární frakce mohou být po zmrazení skladovány po relativně dlouho dobu. Nicméně při jejich použití je třeba přidat do kultivačních médií správné substráty a/nebo koenzymy (Červenková et al., 2001).

Mikrosomy obsahují části endoplazmatického retikula a jsou bohaté na cytochromy P450 (CYP) (Kučera et al., 2006). Široce se používají ke zkoumání metabolického působení enzymů I. a II. fáze biotransformace, které typicky zahrnují izoformy CYP a UDP-glukuronosyltransferasy (Mortensen et al., 2008), nebo také k detekci peroxidace lipidů vyvolané hepatotoxiny. Izolované mitochondrie se používají ke studiu účinku chemických látek na syntézu ATP a oxidaci mastných kyselin. Zatímco izolovaná buněčná jádra můžeme použít pro analýzu genové transkripce (Guillouzo, 1998).

Jaterní cytosolické frakce umožňují analyzovat účinek řady rozpustných enzymů I. a II. fáze biotransformace, jakou jsou např. glutathion-S-transferasa nebo N-acetyltransferasa či různé aldo-ketoreduktasy. Naopak tzv. S9-frakce (supernatant získaný odstředováním jaterního homogenitu při 9 000 x g) zahrnuje jaterní mikrosomy obohacené o cytosolickou frakci. Tento *in vitro* model tedy obsahuje kompletnější baterii metabolických enzymů než jednotlivé zmíněné frakce (Asha et al., 2010; Červenková et al., 2001).

2.3.2 Kultivace izolovaných hepatocytů

Primární kultury hepatocytů jsou považovány za zlatý standard *in vitro* modelu pro hodnocení metabolismu léčiv a jejich toxicity (Gómez-Lechón et al., 2014). Hepatocyty v kultuře plní specializované funkce jater, včetně metabolismu lipidů, detoxikace exogenních xenobiotik, syntézy močoviny a produkce plazmatických proteinů (Baker et al., 2001).

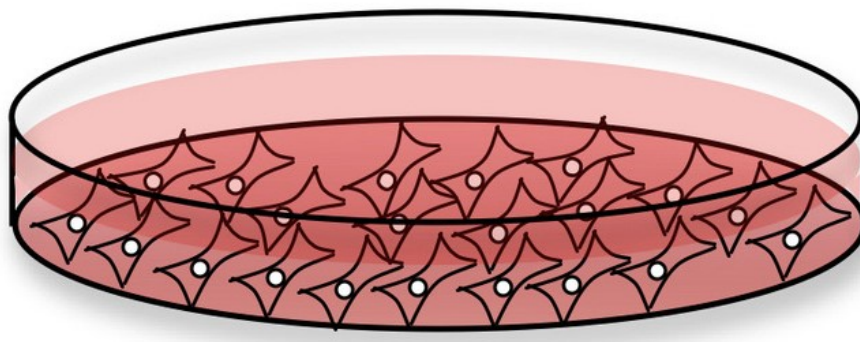
Hepatocyty jsou obvykle izolovány z celých jater nebo z resekované jaterní tkáně. Z důvodu špatné dostupnosti lidských jater se převážně používají játra potkanů (Kučera et al., 2006; Zeilinger et al., 2016). Nicméně poptávka farmaceutického průmyslu po lidských hepatocytech je obrovská a v současné době představují kryoprezervované hepatocyty důležitý zdroj komerčně dostupných buněk. Přestože životaschopnost a funkce hepatocytů může být snížena kryokonzervací, kryoprezervované hepatocyty nabízejí velkou výhodu. Tyto buňky mohou být použity kdykoliv je zapotřebí a jsou snadno dostupné pro rutinní hodnocení metabolismu léků a hepatotoxicity nových potencionálních léčiv (Gómez - Lechón et al., 2014). Další výhodou použití lidských hepatocytů je snadnější extrapolace získaných výsledků do *in vivo* podmínek (Kučera et al., 2006).

Izolace hepatocytů je obvykle prováděna dvoustupňovou kolagenasovou perfúzí jater a díky kolagenase dochází k narušení mezibuněčných kontaktů a komunikačních systémů. Pro zachování některých důležitých rysů diferencovaných buněk jsou však mezibuněčné kontakty důležité. Po izolaci kolagenasou dochází také ke změně tvaru buněk a ztrátě jejich polaritu (Červenková et al., 2001). Izolované hepatocyty lze kultivovat v různém uspořádání: suspenzní kultury, monovrstva hepatocytů, 3D kultury (sandwichové kultury, sféroidy); hepatocyty mohou být kultivovány buď samostatně nebo ko-kultivovány s jinými typy buněk.

Nejjednodušším způsobem kultivace čerstvě izolovaných hepatocytů jsou suspenzní kultury. Tento model představuje snadno dostupný a jednoduchý *in vitro* systém, běžně používaný při vývoji nových léčiv a při zkoumání toxických nebo metabolických účinků xenobiotik. Výhodou buněčných suspenzí může být to, že jsou schopny zajistit dobrý přenos látek mezi kultivačním médiem a hepatocyty. Manipulace s nimi není tak komplikovaná a nejsou ani tolik nákladné jako primární kultury hepatocytů. Využití hepatocytů v suspenzi je však významně omezeno dobou jejich přežití, během které vykazují metabolickou aktivitu. To je důvod, proč mohou být buněčné suspenze používány pouze po dobu čtyř až šesti hodin (Andria et al., 2010; Červenková et al., 2001; Kučera et al., 2006).

Mezi nejčastější způsoby kultivace hepatocytů *in vitro* patří **primární kultury hepatocytů** ve formě tzv. **monovrstvy (obr. 5)**, kdy se na plastovou kultivační nádobu potaženou vrstvou extracelulární matrix (kolagenu) přichytávají hepatocyty a vzniká tak

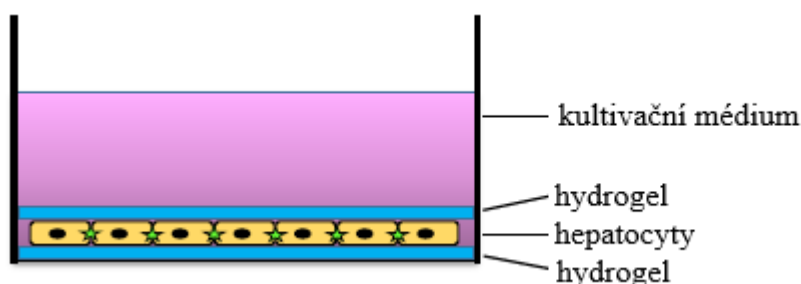
jedna vrstva buněk. Za těchto podmínek procházejí primární hepatocyty změnami v morfologii buněk, struktuře a polaritě (Kučera et al., 2006; Soldatow et al., 2013).



Obrázek 5 Buňky rostoucí v Petriho misce pro tkáňové kultury jsou přichycené ke dnu misky a ponořené v tekutém živném médiu (převzato z (Chow, 2010))

Jednou z nevýhod využití primárních kultur hepatocytů je drastický pokles funkční kapacity jaterních buněk v průběhu času. Funkce specifické pro játra, jako je produkce albuminu a exprese CYP, rychle klesá během prvních 24–48 hodin kultivace (Soldatow et al., 2013). Další nevýhodou je pokles aktivit biotransformačních enzymů a tzv. dediferenciace hepatocytů při které dochází ke ztrátě jedinečných, pro játra specifických funkcí a změně metabolismu fetálních hepatocytů (Kučera et al., 2006).

Zavedenou metodou ke zlepšení stability, funkčnosti a prodloužení viability primárních hepatocytů je překrytí hepatocytů složkami extracelulární matrix (ECM), což vede ke vzniku tzv. **sendvičových kultur** (Roth & Singer, 2014). Mezi dvě vrstvy kolagenového gelu (hydrogel) jsou umístěny hepatocyty (**obr. 6**), čímž se zvýší množství mezibuněčných kontaktů (Kučera et al., 2006).



Obrázek 6 Hepatocyty kultivované v sendvičové konfiguraci (upraveno z (Smutný, 2017))

Kono et al. (1997) provedli studii, ve které zjistili, že lidské hepatocyty v kolagenovém sendviči přežívají déle než 4 týdny, udržují si polygonální tvar s kanalikulárními strukturami a vysokou produkci albuminu po celou dobu kultivace.

Ke kultivaci se dá kromě kolagenu použít také komerčně dostupný Matrigel, což je mezibuněčná hmota získaná z myšího Engelbreth-Holm-Swarmova sarkomu (Kono et al., 1997). Skládá se hlavně z laminu, kolagenu IV, přičemž obsahuje také proteoglykan heparan-sulfát a růstové faktory, které se vyskytují v myším sarkomu (Kastana et al., 2019). Matrigel má však určité nevýhody, je dražší než kolagen a navíc je při použití v lidských buněčných kulturách xenogenní (Andria et al., 2010). V prostředí Matrigelu hepatocyty mění svůj tvar na kubický a udržují si své funkční parametry po dlouhou dobu (Kučera et al. 2006).

Velmi úspěšnou metodou pro udržení funkčních hepatocytů po delší dobu je jejich **ko-kultivace s neparenchymovými buňkami**. Hepatocyty mohou být ko-kultivovány např. s endotelovými buňkami nebo Kuppferovými buňkami (Krause et al., 2009). Výhodou této techniky je prodloužení doby, po kterou jsou uchovány morfologické a funkční charakteristiky hepatocytů (Kučera et al., 2006).

2.3.3 Buněčné linie odvozené z karcinomu jater

Imortalizované buněčné linie odvozené z karcinomu jater představují alternativu k primárním lidským hepatocytům ve vývoji léčiv. Každá buněčná linie karcinomu jater byla odvozena od jednoho dárce, což zabraňuje variabilitě mezi dárci (Vellonen et al., 2014). Obecně platí, že ačkoli jsou tyto buňky metabolicky chudé ve srovnání s hepatocyty, nabízejí klíčové výhody, jako je jejich neomezená životnost, reprodukovatelnost, vysoká dostupnost a snadná manipulace, které z nich činí užitečné *in vitro* systémy pro účely screeningu. Při studiu metabolismu léčiv patří mezi nejčastěji používané jaterní buněčné linie HepG2 a HepaRG buňky (Gómez-Lechón et al., 2014).

Buněčná linie jater **HepG2** pochází z jaterní tkáně patnáctiletého bělocha, který trpěl hepatocelulárním karcinomem (Aden et al., 1979). Exprese izoforem CYP je významně nižší ve srovnání s hladinou nalezenou v primárních lidských hepatocytech (Wilkening & Bader, 2003). Exprese CYP3A4 je v této buněčné linii extrémně nízká. Na druhou stranu CYP3A7 je dostatečně vyjádřen, což naznačuje spíše fetální než adultní jaterní fenotyp HepG2 buněk. Fetální fenotyp HepG2 buněk je dále podpořen

dalšími fakty, jako je exprese fetálního markeru alfa-fetoprotein (Smutný, 2017) a vyšší exprese CYP1A1 ve srovnání s CYP1A2 (Wilkening & Bader, 2003). Podobně jako hepatocyty, HepG2 buňky pěstované ve 3D systémech vykazují lepší životaschopnost a funkčnost, než v konvenčních 2D kulturách a nedávné studie uvádějí jejich potencionální hodnotu pro screeningové testy a mechanistické studie léky indukované hepatotoxicity (Gómez-Lechón et al., 2014).

HepaRG je perspektivní jaterní buněčná linie, která byla odvozena z jaterního karcinomu pacientky, která trpěla hepatocelulárním karcinomem následkem chronické infekce virem hepatitidy C. Za optimálních podmínek exprimují HepaRG buňky biotransformační enzymy na srovnatelných úrovních s primárními lidskými hepatocyty. Buňky také exprimují funkční nukleární receptory PXR a CAR a několik lékových transportérů. Navíc si HepaRG buňky uchovávají relativně stabilní fenotyp, což z nich dělá užitečný buněčný systém pro dlouhodobé studie toxicity (Vellonen et al., 2014).

2.3.4 Trojrozměrné *in vitro* modely

Tradičně se dvojrozměrné (2D) buněčné kultury mohou používat pro krátkodobé zkoumání akutní toxicity a metabolismu léčiv, ale ne pro studium podání opakovaných dávek nebo dlouhodobých účinků léčiv (Ingelman-Sundberg & Lauschke, 2022). Studie ukázaly, že dvojrozměrná buněčná kultura nemůže replikovat reálné mikroprostředí a buněčné chování *in vivo* kvůli nedostatku interakcí buňka-buňka a buňka-matrix, ztrátě specifické tkáňové architektury, mechanických a chemických podnětů, které jsou nezbytné pro jedinečné funkce reálných tkání v lidském těle (Cui et al., 2017). Proto vznikly snahy o vytvoření 3D modelů, v nichž by se buňky nacházely v kontaktu s dalšími buňkami a matrix. Mezi často používané 3D modely patří jaterní sféroidy a PCLS.

2.3.4.1 Jaterní sféroidy

Ve srovnání s dvourozměrnými modelovými systémy jsou 3D buněčné agregáty nazývané kvůli svému kulovitému tvaru (multicelulární) sféroidy, považovány za fyziologičtější a tato technika byla využita v oblasti onkologie, biologie kmenových buněk a tkáňového inženýrství (Cesarz & Tamama, 2016). Sféroidy mohou být vytvořeny jak z izolovaných hepatocytů, tak z buněk imortalizovaných buněčných linií. Tyto 3D kultury, jejichž přípravou jsem se zabývala, více popisuji v kapitole 2.5.

2.3.4.2 Ultratenké jaterní řezy

Dalším *in vitro* modelem, který se často využívá, jsou ultratenké jaterní řezy, které se používají již od roku 1980. Většinou se připravují o tloušťce 150–250 μm a průměru 3–8 mm. V současné době se PCLS využívají především ke studiu metabolismu přírodních a syntetických látek. Dále se také používají pro klasičtější studie, jako je zkoumání různých oblastí fyziologie orgánů (Červenková et al., 2001).

Jednou z výhod tohoto modelu je zachování integrity vazeb mezi buňkami a ECM (Guillouzo, 1998). Příprava a práce s PCLS je rychlá a snadná. Přebytný materiál může být kryoprezervován a skladován až do dalšího pokusu. Ultratenké řezy mohou být připraveny z široké škály orgánů. Přítomny jsou všechny typy buněk z původní tkáně a jejich strukturální a funkční heterogenita zůstává nedotčená. Další důležitou vlastností je možnost mezidruhového srovnání. Různé experimenty mohou být prováděny jak v krátkodobých, tak i v dlouhodobých inkubacích (Červenková et al., 2001). Podle dostupných údajů lze PCLS inkubovat až po dobu 15 dnů (Wu et al., 2018).

Podobně jako u jiných *in vitro* modelů, také u PCLS dochází k poklesu exprese CYP a dalších biotransformačních enzymů během inkubační doby, který je pravděpodobně spojen s absencí vhodných induktorů v inkubačním médiu (Červenková et al., 2001). Dostupnost lidských PCLS je extrémně omezená a jaterní funkce nezůstávají dlouho stabilní kvůli omezenému šíření kyslíku a živin z inkubačního média (Andria et al., 2010). Další nevýhodou tohoto modelu je rozvoj fibrózy při prodloužené inkubaci PCLS. Ve srovnání s primárními hepatocyty, které jsou vystaveny škodlivým proteolytickým enzymům během jejich izolace, jsou PCLS poškozeny pouze na povrchu preparátů krájením (Lake & Price, 2013). Dále je známo, že PCLS jsou vystaveny oxidačnímu stresu, který vzniká v jedné důsledku krájení a také vlivem vysoké teze kyslíku, která je nezbytná pro jejich kultivaci (Martin et al., 2002).

2.3.5 Model perfundovaných jater

Jedná se o model, který má nejbližší k *in vivo* podmínkám. Hlavními výhodami je, že je zachována trojrozměrná struktura tkáně, tvorba žluči a možný sběr žluči. Naopak nevýhodami jsou časová a prostorová náročnost, obtížná manipulace

a krátkodobá životnost. Navíc oproti jiným *in vitro* modelům nesnižuje použití perfundovaných izolovaných jater počet pokusných zvířat a lidské vzorky nejsou dostupné (Godoy et al., 2013; Guillouzo, 1998; Kučera et al., 2006).

V **tab. 1** jsou shrnuty výhody a nevýhody jednotlivých *in vitro* modelových systémů.

Tabulka 1 Shrnutí výhod a nevýhod modelových systémů jater (upraveno z (Spielmann et al., 1998))

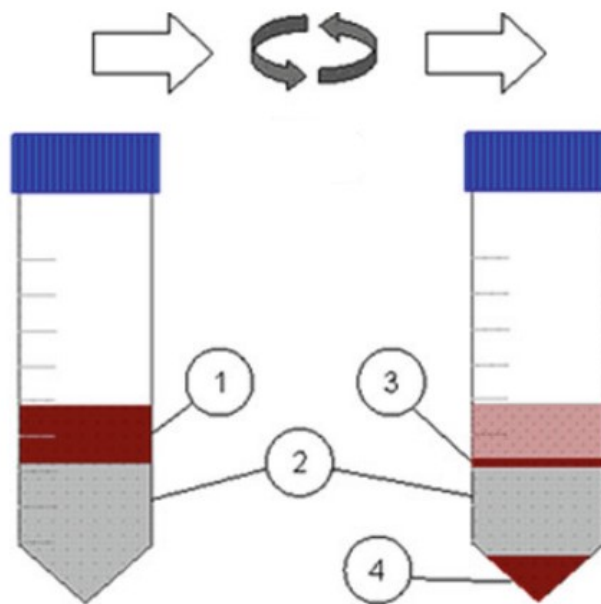
<i>In vitro</i> systém	Výhody	Nevýhody
Subcelulární frakce	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchá příprava • možnost mezidruhové studie 	<ul style="list-style-type: none"> • potřeba přidat správné substráty a/nebo koenzymy do kultivačních médií • dostupné pouze pro krátkodobé studie
Primární kultury hepatocytů	<ul style="list-style-type: none"> • vysoká funkčnost • možná detekce genetických polymorfismů • mezidruhové studie 	<ul style="list-style-type: none"> • časné fenotypové změny • pokles aktivit biotransformačních enzymů
Buněčné linie odvozené z karcinomu jater	<ul style="list-style-type: none"> • neomezená životnost • reprodukovatelnost • vysoká dostupnost 	<ul style="list-style-type: none"> • metabolicky chudé ve srovnání s hepatocyty
Ultratenké jaterní řezy	<ul style="list-style-type: none"> • možnost histologického vyšetření • rychlá a snadná příprava a práce 	<ul style="list-style-type: none"> • nemožný sběr žluči • omezená dostupnost lidských vzorků • rozvoj fibrózy při prodloužené kultivaci
Model perfundovaných jater	<ul style="list-style-type: none"> • funkce blízké funkcím orgánu <i>in vivo</i> • tvorba žluči • možný sběr žluči 	<ul style="list-style-type: none"> • časová a prostorová náročnost • obtížná manipulace • krátkodobá životnost

2.4 Izolace hepatocytů

Počáteční pokusy o izolování lidských hepatocytů mechanickými metodami nebyly příliš úspěšné a týkaly se spíše výtěžku buněk než integrity, životaschopnosti a funkčnosti buněk. Velkého pokroku bylo dosaženo zavedením enzymů, jako je kolagenasa a hyaluronidasa, jako disociačních činidel (Papeleu et al., 2006). V roce 1969 vyvinuli M. N. Berry a D. S. Friend kolagenasové perfúze jater. V důsledku toho

se významně zvýšil výtěžek hepatocytů. Od té doby prošla metoda mnoha modifikacemi (Guillouzo, 1998).

Izolační roztoky jsou citlivé na změny teplot. Ta by měla být přibližně 37–38 °C. Pokud je výtěžek izolovaných jaterních buněk nízký, měly by být odstraněny ze suspenze kontaminující neparenchymální buňky (Li et al. , 2017). Suspenze hepatocytů se čistí na základě různé hustoty hepatocytů a neparenchymálních buněk pomocí přípravku Percoll, což je tekutina s nízkou hustotou obsahující koloidní částice oxidu křemičitého potažené polyvinylpyrrolidonem (Horner et al., 2019). Centrifugací tohoto roztoku dojde na základě hustoty k rozdělení buněk. Percoll se dále používá k přečištění suspenze hepatocytů. Když převrstvíme hepatocyty vrstvou Percollu, po centrifugaci se vytvoří třetí vrstva obsahující mrtvé buňky a části buněk (**obr. 7**) (Knobeloch et al., 2011).



Obrázek 7 Centrifugace v hustotním gradientu s použitím roztoku Percoll. (1) buněčná suspenze; (2) vrstva Percollu; (3) buněčný odpad a odumřelé buňky zbylé na povrchu Percollu (4) buněčná peleta živých buněk (převzato z (Knobeloch et al., 2011))

Jelikož Ca^{2+} (vápenaté) ionty jsou důležité pro správnou aktivitu kolagenas a zároveň musí být buňky během izolace vystaveny nízké koncentraci těchto iontů, řešením bylo zavedení jednostupňové nebo dvoustupňové kolagenasové perfúze (Guillouzo, 1998).

2.4.1 Jednostupňová kolagenasová perfúze

Tento typ perfúze je založen na skutečnosti, že potřebná koncentrace Ca^{2+} iontů pro správnou aktivitu kolagenasy je mnohem nižší než koncentrace, při které by bylo možné zachovat integritu desmosomálních spojů. Tím pádem se aplikuje snížená koncentrace Ca^{2+} iontů a v jednom kroku nastane jak rozrušení desmosomálních spojů mezi buňkami, tak rozrušení ECM díky dostatečné aktivitě kolagenas (Guillouzo, 1998; Jakubíčková, 2009).

2.4.2 Dvoustupňová kolagenasová perfúze

Techniku perfúze upravil a zjednodušil v roce 1976 Seglen, který vyvinul metodu dvoustupňové kolagenasové perfúze, která se nyní široce používá (Guillouzo, 1998). Postup metody zahrnuje dva kroky. V prvním kroku se provádí proplachování jater médiem bez Ca^{2+} , obsahujícím chelátor vápníku (např. EDTA, EGTA nebo citrát). Odstranění iontů vápníku z epiteliálních buněk vede k rychlé destrukci mezibuněčných spojů. V druhém kroku jsou játra proplachována pufrovým roztokem obsahujícím Ca^{2+} a kolagenasu, což naruší ECM (Li et al., 2010; Mitry et al., 2002).

Následně probíhá stejný postup jako u jednostupňové kolagenasové perfúze. Jaterní tkáň je mechanicky rozrušena. Následuje filtrace, centrifugace a propláchnutí získané pelety ledovým pufrovým roztokem za účelem odstranění pojivové tkáně, mrtvých hepatocytů a jaterních neparenchymálních buněk (Mitry et al., 2002; Vinken et al., 2012). Po izolaci mohou být buňky buď použity ke krátkodobým studiím, nebo udržovány po delší dobu ke studiu dlouhodobých změn genové exprese (Li et al., 2010).

Dvoustupňová kolagenasová perfúze poskytuje velké množství hepatocytů s dobrou životaschopností, a proto jejich kultury poskytují dobře srovnatelný systém s podmínkami *in vivo* alespoň na krátkou dobu (Vinken et al., 2012).

2.4.3 Faktory ovlivňující účinnost izolace hepatocytů

Množství a kvalita izolovaných hepatocytů se liší v závislosti na kvalitě použité tkáně, složení roztoků perfúzního pufru a typu a koncentraci kolagenasy. Kolagenasa je připravována z bakterií a skládá se ze směsi špatně purifikovaných enzymů, která může mít nekonzistentní enzymatický účinek, který se liší mezi jednotlivými šaržemi. Mimo

kolagenasy obsahuje tato směs i další proteasy, které vyvolávají nežádoucí enzymatické reakce, které ovlivňují kvalitu a množství životaschopných/zdravých buněk (Mitry et al., 2002).

Odstranění Ca^{2+} iontů je nezbytné k narušení molekul Ca^{2+} -dependentního E-kadherinu mezi sousedními hepatocyty a tím ke zlepšení jak kvantity, tak kvality rozptýlených hepatocytů. Přítomnost Ca^{2+} je také nutná pro enzymatickou aktivitu kolagenasy během perfúze. S ohledem na tyto vlastnosti Ca^{2+} jsou koncentrace i načasování zpětného vpuštění těchto iontů do jater během izolace hepatocytů rozhodující pro získání intaktních buněk. Hodnota pH perfúzního média by měla být udržována kolem 7,4. Rychlý pokles pH během perfúze je způsoben buď rozpadem glukózy v médiu nebo vznikem bikarbonátu z rozpuštění oxidu uhličitého ve vodě. Proto je pro zajištění zdravých buněk nezbytné pufrovací činidlo, jako je např. hydroxid sodný, hydrogenuhličitan a organický pufr kyselina 4-(hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfanová (HEPES). Izolace může být také ovlivněna dalšími faktory, jako je rychlost průtoku perfúzního (optimálně 5 ml/min u myších jater) nebo síla odstředění po izolaci (optimálně 50–100 x g u izolace jaterních buněk myši) (Li et al., 2017).

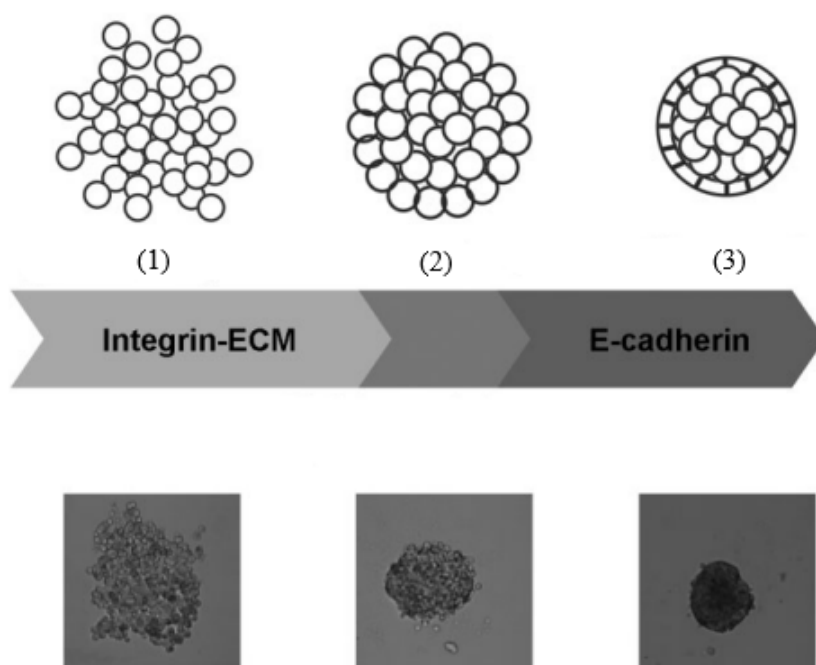
2.5 Multicelulární sféroidy

Multicelulární sféroidy („multicellular spheroid“, MCS) jsou kulovité mnohobuněčné agregáty o velikosti kolem 100 μm , které tvoří jednoduché trojrozměrné systémy. Poprvé byly popsány Holtfreterem v roce 1944 (Lin & Chang, 2008). MCS vznikají procesem buněčné agregace. Lze je vytvořit jak z izolovaných primárních hepatocytů, tak z buněk nádorových linií. Jejich tvorba bývá velmi rychlá a relativně levná ve velkém množství (Page et al., 2012). Ukázalo se, že mají určité výhody ve srovnání s 2D systémy. Sféroidy jaterních buněk vykazují delší dobu přežití, vyšší expresi a syntézu specifických jaterních markerů, jako jsou hepatální jaderný faktor 4 α , albumin a močovina, zvýšenou metabolickou aktivitu a produkci vlastní ECM (Smutný, 2017). Díky zvýšenému počtu mezibuněčných interakcí je udržována strukturální a funkční polarita buněk. Nevýhodou sféroidů je jejich tendence se shlukovat, což následně vede ke smrti buněk uprostřed agregátů a zániku sféroidů (Kučera et al., 2006).

Buněčné sféroidy se hodně využívají v oblasti onkologie, dokážou simulovat chování nádorů mnohem přesněji než 2D kultury. Podobně jako nádory obsahují proliferující a neproliferující buňky, místa s odlišnou úrovní okysličení a buňky zanořené v agregátu buněk i s obnaženými povrchy (Page et al., 2012).

2.5.1 Molekulární mechanismy tvorby sféroidů

Stejně jako v embryonálním vývoji a tkáňové morfogenezi, přispívají k tvorbě MCS komplexní buněčná adheze a diferenciace. Pomocí specifických protilátek blokuji integriny a kadheriny v kultuře jaterních buněk bylo zjištěno, že proces tvorby sféroidu zahrnuje 3 základní fáze (**obr. 8**): 1) Nejprve dlouhá vlákna ECM obsahující vícenásobné sekvence RGD (tripeptid arginin-glycin-aspartát) se naváží na integriny na povrchu buňky a zajistí tak rychlou agregaci rozptýlených buněk v suspenzi. 2) Následuje fáze „zpoždění“ („*delay phase*“), která je charakterizována zvýšenou expresí kadherinů. 3) V poslední fázi poskytují vazby kadherin-kadherin mezi dvěma buňkami silnou buněčnou adhezi a díky tomu vzniká sféroid (Cimr, 2016; Lin & Chang, 2008).



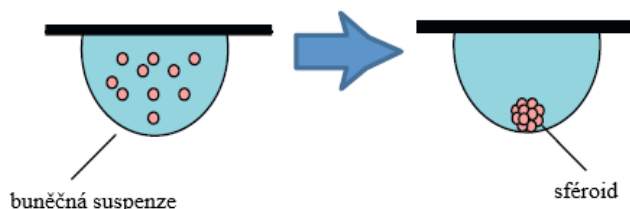
Obrázek 8 Model procesu tvoření MCS: (1) tvorba agregátů z volných buněk vazbami integrin-ECM (2) exprese a akumulace kadherinů (3) tvorba kompaktního sféroidu; upraveno z (Lin & Chang, 2008)

2.5.2 Kultivace sféroidů

Sféroidy mohou být tvořeny několika způsoby, které jsou popsány níže. Hlavními hledisky při výběru vhodné techniky jsou čas potřebný k produkci sféroidů, vyprodukované množství, zda mají sféroidy homogenní geometrii a jakékoliv případné účinky na buněčné chování (Page et al., 2012). Metody tvorby sféroidů můžeme rozdělit na metody nezávislé na ukotvení a metody závislé na ukotvení. Do první skupiny, která je přístupnější tvorbě buněčných a fyziologických gradientů, patří metoda visící kapky, metoda „*forced-floating*“, metody založené na míchání, mikrofluidní kultivační techniky a metoda magnetické levitace. Druhá skupina lépe napodobuje interakci buněk s ECM a vyžaduje přítomnost opěrné struktury („*scaffold*“) (Langhans, 2018).

2.5.2.1 Metoda visící kapky

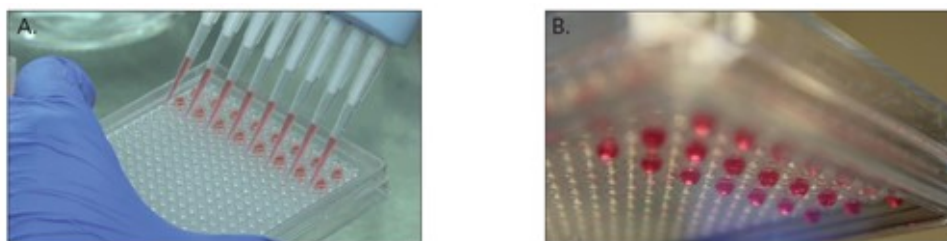
Tato metoda umožňuje jednotlivým buňkám agregovat a vytvářet sféroidy ve formě kapiček (**obr. 9**). Nejprve se nanese buněčná suspenze v kapce média pomocí pipety na desku. Každá kapka má objem přibližně 15–30 μl a obsahuje cca 300–3000 buněk. Následně se po převrácení vytvoří kapka, která je udržována díky povrchovému napětí a na špičce kapky na rozhraní média a vzduchu se vytvoří sféroid.



Obrázek 9 Metoda visící kapky (upraveno z (Breslin & Driscoll, 2013))

Regulací objemu kapky nebo hustoty buněčné suspenze, lze kontrolovat velikost sféroidu. Metoda visící kapky je poměrně jednoduchá a uvádí se, že má reprodukovatelnost téměř 100% pro výrobu jednoho 3D sféroidu na kapku. Mezi výhody této metody patří možnost vytvářet různě velké sféroidy, jednoduché provedení a rychlá tvorba sféroidu. Dále také to, že není potřeba drahé nebo profesionální vybavení pro tvorbu sféroidů; velké množství sféroidů se dá vytvořit pipetováním pomocí multikanálové pipety a sklídit seškrábáním z víčka kultivační destičky. Naopak

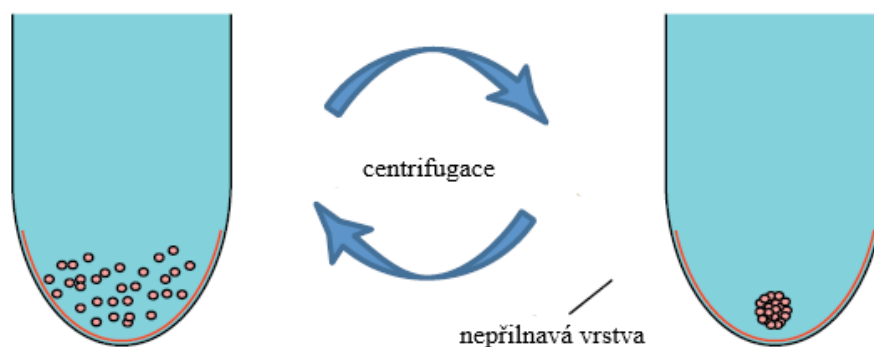
potencionální nevýhodou může být omezení objemu kapky buněčné suspenze (obvykle max. do 50 μ l) nebo obtížnost výměny kultivačního média bez poškození sféroidu. Metodu lze provádět pomocí komerčně dostupných desek, jako je Perfecta3D (**obr. 10**) GravityPLUS (Breslin & Driscoll, 2013; Lin & Chang, 2008; Ryu et al., 2019).



Obrázek 10 Příprava sféroidů metodou visací kapky v destičkách Perfecta3D (převzato z (Larson, 2015))

2.5.2.2 Metoda „forced-floating“

Poměrně jednoduchou metodou pro generování 3D sféroidů je zabránit jejich přichycení k povrchu kultivační nádoby jeho úpravou, což vede k nucenému plování buněk (**obr. 11**). To podporuje vznik kontaktů mezi buňkami, což zase podporuje spontánní tvorbu sféroidů (Lin & Chang, 2008). Tato metoda je nazývána také metoda „liquid-overlay“. Techniku lze použít ke kultivaci extrahovaných lidských nádorů. Kultivované buňky si uchovávají mnoho morfologických rysů původního nádoru, včetně přítomných makrofágů a pojivové tkáně (Page et al., 2012). Tato metoda se využívá i k přípravě sféroidů z izolovaných primárních hepatocytů (Ingelman - Sundberg & Lauschke, 2022).



Obrázek 11 Metoda „forced-floating“ (upraveno z (Breslin & Driscoll, 2013))

S využitím tohoto přístupu vyvinuli Ivascu a Kubbies metodu pro výrobu 3D sféroidů z nádorových a nenádorových buněk, která umožňuje rychlou tvorbu sféroidů v kulatých nebo kuželovitých mikrotitračních destičkách s 96 jamkami. Povrch těchto destiček byl potažen polyhydroxyethylmethakrylátem (poly-HEMA). Při jejich studiích byla nasazena buněčná suspenze a destičky byly následně odstředěny, aby buňky k sobě přilnuly (Ivascu & Kubbies, 2006). Destičky potažené poly-HEMA mají velmi nízkou adhezivitu a označují se jako ULA destičky („*ultra-low attachment*“). Tyto ULA destičky byly použity v experimentální části této diplomové práce.

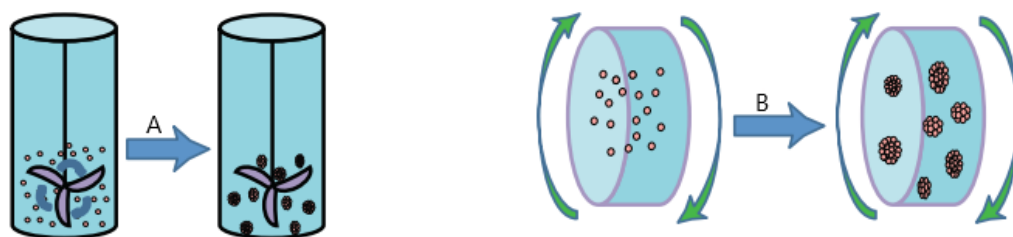
Tato metoda je jednoduchá a obecně reprodukovatelná, protože do každé jamky lze nasadit stejný počet buněk pro tvorbu sféroidů s konzistentní velikostí. U větších sféroidů se jednoduše nasadí větší množství buněk. Jelikož jsou tyto 3D sféroidy obvykle generovány v 96 jamkové destičce, snadno se vyrábí velké množství morfologicky homogenních sféroidů (Breslin & Driscoll, 2013).

Na základě stejného principu, kdy se jednoduše zabráni adhezi buněk na kultivační nádobu, lze vytvořit 3D kultury použitím 1,5% agarózy v kultivačním médiu, která vytvoří na povrchu kultivační nádoby tenký film. Agaróza zabraňuje přilnavosti buněk k povrchu, což vede k vytvoření sféroidů. Metoda s použitím agarózy je jednoduchá, levná a je navržena tak, aby umožňovala dlouhodobou kultivaci buněk (více než 20 dní). Nevýhodou je čas a práce potřebná k potažení destiček před nasazením buněk. Předem potažené destičky jsou sice komerčně dostupné (např. destička PrimeSurface), avšak zvyšují celkové náklady (Breslin & Driscoll, 2013).

2.5.2.3 Metody založené na míchání

Techniky založené na míchání („*agitation*“) můžeme rozdělit do dvou kategorií: 1) bioreaktory s rotační baňkou (**obr. 12A**) a 2) rotační bioreaktory pro buněčné kultury (**obr. 12B**). Principem těchto metod je umístění buněčné suspenze do nádoby a její udržení v neustálém pohybu, a to buď mírným mícháním, nebo rotací nádoby. Nepřetržitý pohyb znamená, že buňky nepřilnou ke stěnám nádoby, ale místo toho dojde ke vzniku mezibuněčných interakcí a tvorbě sféroidů. Mezi výhody této metody patří jednoduchá kultivace z buněčné suspenze či snadná kultivace ve velkém množství. Naopak nevýhodou těchto metod je, že metody vyžadují speciální vybavení, chybí kontrola nad počtem a velikostí sféroidů a buňky jsou vystaveny stříhovým silám

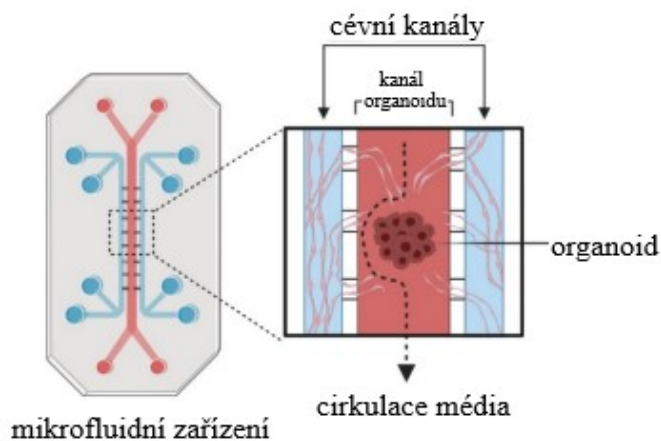
vlivem míchání, což přináší možnost narušení struktury sféroиду u citlivějších buněk (Breslin & Driscoll, 2013).



Obrázek 12 Metody založené na míchání: A) bioreaktor s rotační baňkou; B) rotační bioreaktor pro buněčné kultury (upraveno z (Breslin & Driscoll, 2013))

2.5.2.4 Technika mikrofluidní kultury

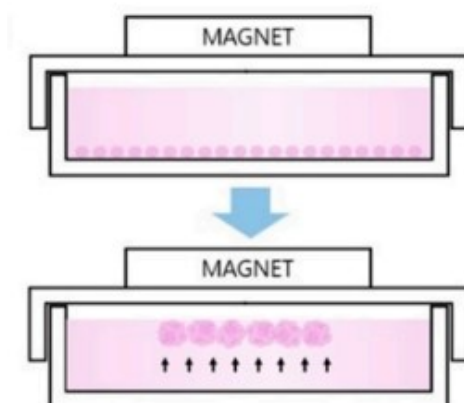
Tato technika, nazývána také jako „lab-on-a-chip“, se používá pro tzv. „single cell“ analýzy, genetické testy a studie lékové toxicity. Metoda má mikroskopické rozměry odpovídající rozsahu mikrostruktur *in vivo* (**obr. 13**). Jedním z rysů mikrofluidní metody je, že integruje více procesů včetně zachycení buněk, míchání, detekce a kultivace buněk. Dalším rysem je značně vysoká propustnost buněk pro buněčnou analýzu. V současné době může fluidní systém produkovat dostatečnou koncentraci směsi analytů a usnadňuje monitorování živých buněk v reálném čase. Kromě toho tento systém může optimalizovat podmínky buněčné kultury pro proliferaci a diferenciaci kmenových buněk, a může být použit pro procesy tkáňového inženýrství, jako je náhrada orgánů a regenerace tkání, a v budoucích klinických studiích (Ryu et al., 2019).



Obrázek 13 Zařízení pro mikrofluidní metodu (převzato z (Gunti et al., 2021))

2.5.2.5 Magnetická levitace

Magnetická levitace je metoda, která byla vyvinuta nedávno a která nabízí alternativní způsob pro tvorbu sféroidů (Lewis et al., 2017). Kultivace využívá magnetické částice a integraci s hydrogely podle daných podmínek. Buňky jsou smíchány s magnetickými částicemi a jsou vystaveny magnetické síle (**obr. 14**). Díky magnetické síle levitují buňky spojené s magnetickými částicemi proti gravitaci. Tento stav vyvolá změnu geometrie buněčné hmoty a podporuje kontakt mezi buňkami, což vede k jejich agregaci (Ryu et al., 2019).



Obrázek 14 Magnetická levitace (převzato z (Ryu et al., 2019))

Výhodou použití magnetických částic nazývaných Global Eukaryotic Microcarriers je jejich velký povrch, který umožňuje kultivaci velkého počtu buněk. Další výhodou, kterou s sebou přináší přítomnost magnetické částice, je snadná kontrola při výměně kultivačního média a při sklizení sféroidů. Nevýhodou je naopak potřeba speciálního vybavení, finanční náročnost magnetických částic a jejich možná toxicita pro kultivované buňky (Breslin & Driscoll, 2013).

2.5.2.6 Biomateriály

Druhou skupinou metod pro přípravu sféroidů jsou metody založené na opěrném systému pro buňky, který je tvořen různými biomateriály. Přirozená ECM může být v 3D modelech jaterních buněk nahrazena biomateriály. Optimální biomateriály by měly odpovídat fyziologické ECM prostorovým a chemickým složením. Kromě toho musí být biomateriály biokompatibilní a měly by poskytovat mechanickou podporu a

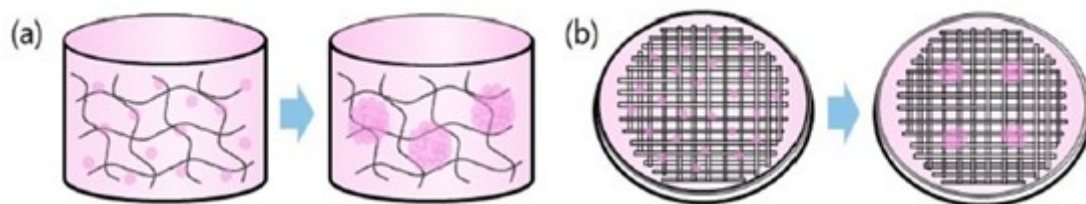
signální informace buňkám. Takové vlastnosti umožňují buněčný růst, přilnavost a diferenciaci (Vellonen et al., 2014). Mezi využívané podpůrné systémy patří hydrogely a biofilmy (**obr. 15**).

Extracelulární matrix je nebuněčná složka, která obklopuje buňky a funguje jako fyzikální lešení buněk. ECM se skládá ze dvou hlavních skupin makromolekul. Jednou jsou proteoglykany, hydrofilní molekuly složené z glykosaminoglykanů spojených se specifickými jádrovými proteiny. Důležité je, že proteoglykany tvoří v extracelulárním prostoru hydratovaný gel, který zajišťuje hydrataci a odolnost tkáně vůči síle. Druhou skupinou jsou vláknité proteiny včetně kolagenů, elastinu, fibronektinu a lamininů, které poskytují pevnost v tahu, zprostředkovávají vazbu buněk a ovlivňují buněčné funkce. Interakce buňka-ECM jsou realizovány prostřednictvím povrchových receptorů buněk, jakou jsou integriny (Frantz et al., 2010).

Hydrogely patří mezi nejvýznamnější biomateriály používané pro 3D kultivaci hepatocytů. Skládají se z fyzikálně a chemicky zesíťovaných hydrofilních polymerů s vysokou koncentrací vázané a volné vody. Mechanické, citlivé a difúzní vlastnosti hydrogelu lze přizpůsobit pro každý typ buňky. Buňky lze kultivovat buď na povrchu gelu nebo je možné je zabudovat do hydrogelu (Vellonen et al., 2014). Hydrogely lze rozdělit podle jejich původu na přírodní a syntetické materiály. Přírodní hydrogely získané ze živočišných zdrojů zahrnují např. kolagen, fibrin a kyselinu hyaluronovou. Ze syntetických materiálů se pro přípravu hydrogelů používají např. poly(vinylalkohol), poly(ethylenglykol) a poly-HEMA (Ruedinger & Lavrentieva, 2014). Úpravou fyzikálních vlastností hydrogelových materiálů lze optimalizovat velikost sféroidů. Pro kontrolu velikosti sféroidu lze použít slabé lepící materiály a vyrobit fyzikálně reliéfní obrazce na povrchu hydrogelu (Ryu et al., 2019).

Sféroidy nádorových buněk lze také kultivovat na filmech z biomateriálů (**biofilmech**) pro jejich roli v objevu protinádorových léků. Kromě nich lze na biofilmech kultivovat i kmenové buňky. Poměry složek použité v biofilmech jsou rozhodující pro velikost sféroidů a rychlost tvorby sféroidů, stejně jako buněčná adheze a proliferace. Jedním z biomateriálů používaných v takových filmech je chitosan. Bylo zjištěno, že chitosanový film modifikovaný kyselinou hyaluronovou vytváří větší sféroidy a indukuje agregaci buněk v kratším čase než nemodifikovaný chitosanový film. Velikost sféroidu je také ovlivněna tloušťkou filmu. Její snížení vede ke snížení

velikosti sféroidu. V poslední době byl také jako kultivační materiál pro buňky zkoumán grafen. Grafenové filmy mohou poskytnout charakteristické prostředí prospěšné pro neurogenezi (Ryu et al., 2019).



Obrázek 15 Příklady použití biomateriálů při kultivaci sféroidů: a) hydrogely, b) biofilmy (převzato z (Ryu et al., 2019))

V následující tabulce (**tab. 2**) jsou shrnuty hlavní výhody a nevýhody jednotlivých typů přípravy sféroidů.

Tabulka 2 Shrnutí výhod a nevýhod jednotlivých typů příprav sféroidů (upraveno z (Breslin & Driscoll, 2013))

Typ metody	Výhody	Nevýhody
Metoda visící kapky	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduché provedení • rychlá tvorba sféroidu • nízká cena při použití standardní 96-ti jamkové destičky 	<ul style="list-style-type: none"> • malý kultivační objem buněčné suspenze • obtížnost výměny kultivačního média bez poškození sféroidu
Metoda „forced-floating“	<ul style="list-style-type: none"> • jednoduchost • nízká cena • vzniklé sféroidy jsou snadno dostupné 	<ul style="list-style-type: none"> • čas a práce k potažení destiček
Metody založené na míchání	<ul style="list-style-type: none"> • snadná kultivace ve velkém množství • jednoduchá kultivace z buněčné suspenze 	<ul style="list-style-type: none"> • speciální vybavení • časová náročnost • žádná kontrola nad počtem buněk/velikostí sféroidu
Mikrofluidní metoda	<ul style="list-style-type: none"> • vysoká propustnost buněk pro buněčnou analýzu 	<ul style="list-style-type: none"> • speciální vybavení • obtížnost další analýzy vzniklých 3D kultur
Magnetická levitace	<ul style="list-style-type: none"> • možná kultivace velkého počtu buněk • snadná kontrola při výměně kultivačního média a při sklizení sféroidů 	<ul style="list-style-type: none"> • speciální vybavení • finanční náročnost magnetických částic

3. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zavést a optimalizovat metodu přípravy jaterních sféroidů. K dosažení vytyčených cílů bylo třeba v rámci experimentální části provést následující úkony:

- izolace hepatocytů
- příprava sféroidů
- ověření viability sféroidů měřením produkce ATP
- ověření syntetické funkce hepatocytů pomocí produkce albuminu
- určení optimálního počtu sféroidů pro izolaci RNA
- ověření exprese mRNA biotransformačních enzymů

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Přístroje, chemikálie a roztoky, materiál a pomůcky*

Přístroje:

- centrifugy – Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific
- detektor – Uvitec Cambridge Alliance
- hlubokomrazicí box – Vxe Series Jouan, Thermo Scientific
- laminární box – AURA vertical SD4
- luminometr – Tecan Infinite M200
- míchačka – IKA Color Squid Hytrel HTR 8068
- mikroskop – NIB 100, Novel Optics
- minicentrifugy – Sprout, Heathrow Scientific
- PCR cykléry – MJ mini, BioRad
- pH metr, SI Analytics
- real-time PCR přístroj – Quant Studio 6, Applied Biosystems
- spektrofotometr – NanoDrop 2000 Thermo Scientific
- termostat – Eppendorf Thermomixer Comfort
- třepačka – n-Biotek
- váhy – Scaltec SBC 22, Sartorius CP225D
- vortexy – V-1 plus, BioSan

Chemikálie a roztoky:

- běžné chemikálie třídy p. a.
- dNTPs (deoxyribonukleotidy) – Eurogentec
- DTT (dithiotreitol) – Eurogentec
- reverzní transkriptasa (RT) – ProtoScript II – New England BioLabs
- Trizol reagent – Molecular Research Center

Biologický materiál:

- játra samců a samic potkana kmene Wistar

Pomůcky:

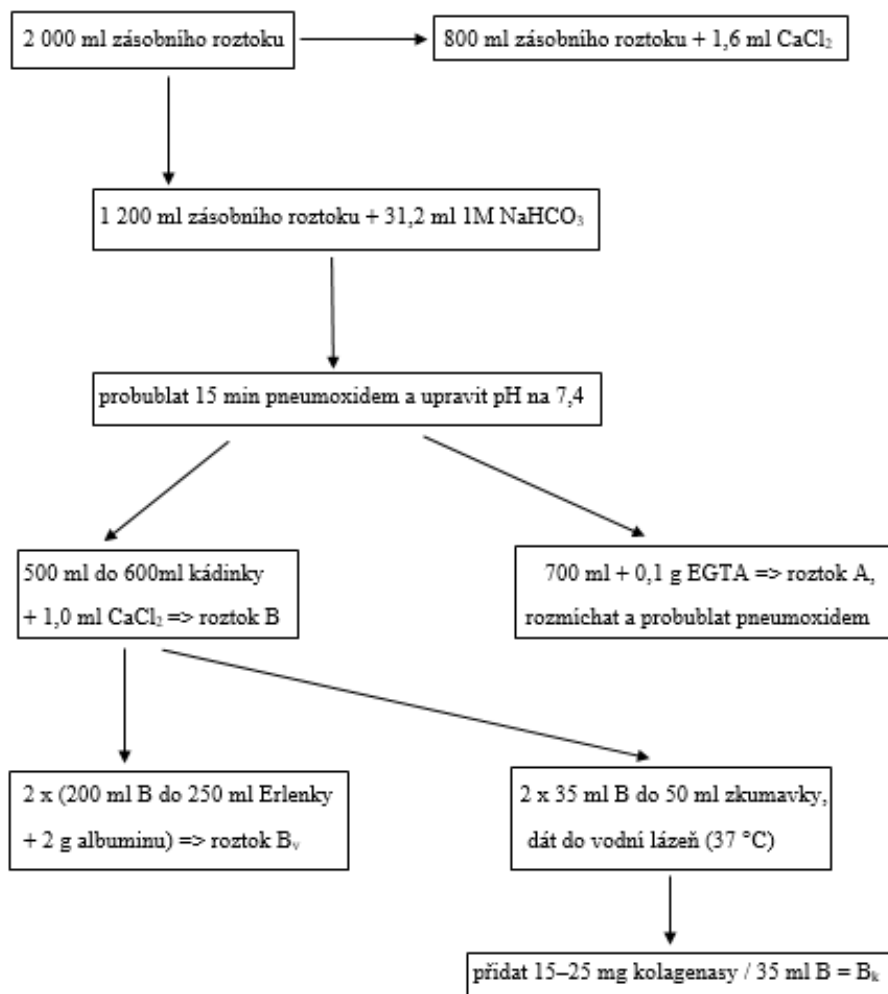
automatické pipety, mikrozkušavky typu *Eppendorf*, PCR destička, jednorázové gumové rukavice, sterilní jednorázové pipety (5 a 10 ml), kádinky, špičky (sterilní i nesterilní), Bürkerova komůrka, stojan na zkumavky, počítadlo buněk, Erlenmeyerova baňka, chladicí deska

4.2 Metody

4.2.1 Izolace hepatocytů a tvorba jaterních sféroidů

4.2.1.1 Příprava roztoků na izolaci hepatocytů

Nejprve jsme připravili 2 l zásobního roztoku, který vznikl smícháním 1780 ml redestilované vody, 200 ml roztoku solí a 20 ml Na/K fosfátového pufru. Z něj jsme připravili roztok C. Odebrali jsme 800 ml zásobního roztoku, přidali 1,6 ml CaCl₂, 0,8 ml glukózy a následně jsme upravili pH roztoku na 7,4. Zbývajících 1 200 ml zásobního roztoku jsme přelili do kádinky a přidali 31,2 ml 1M NaHCO₃. Roztok jsme dali ohřát na 15 min do vodní lázně (37 °C) a poté probublali pneumoxidem po dobu 15 min a upravili se pH na hodnotu 7,4. Z tohoto roztoku jsme odebrali 700 ml a přidali 0,1 g kyseliny ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)tetraoctové (EGTA), tím vznikl roztok A, který jsme pak promíchali, dali do vodní lázně (37 °C) a probublali pneumoxidem. Ze zbývajících objemu jsme odebrali 500 ml a přidali 1 ml CaCl₂, čímž vznikl roztok B. Z roztoku B jsme připravili 2x roztok B_v (200 ml roztoku B + 2 g albuminu) a 2x roztok B_k (35 ml roztoku B do 50ml plastové zkumavky, kterou jsme dali do odsávací baňky a tu jsme vložili do vodní lázně (37 °C) a těsně před promýváním jater jsme přidali 15–25 mg kolagenasy). Schéma přípravy roztoků můžeme vidět na **obr. 16**.



Obrázek 16 Schéma přípravy roztoků na izolaci hepatocytů

4.2.1.2 Izolace hepatocytů

Jednotlivé jaterní laloky jsme dali do Büchnerovy nálevky (s odpadní baňkou) a provedli jejich perfúzi postupnou a opakovanou kanylací hlavních tepen (žil). První perfúzi jsme provedli pomocí roztoku A, tj. roztokem bez vápníku, při teplotě 37 °C, sycený pneumoxidem, bez recirkulace roztoku. Proplach roztokem A slouží k odstranění krve a zeslabení buněčných spojů v důsledku chelatace vápníku. Z hadiček jsme promytím destilovanou vodou odstranili roztok A. Následovala druhá perfúze jater roztokem B_k (s kolagenasou a vápníkem) při teplotě 37 °C po dobu 3–8 min s recirkulací.

Játra jsme poté dali do skleněné misky chlazené ledem a přidali roztok B_v (s vápníkem a albuminem, bez kolagenasy). Po rozrušení jaterních obalů je možné do roztoku B_v vytřepat uvolněné hepatocyty. Suspenzi hepatocytů jsme přefiltrovali

přes nylonové sítko a stočili v centrifuze (4 °C; 40 x g; 5 min). Poté jsme odstranili supernatant, peletu propláchli chlazeným roztokem C a suspenzi znovu stočili (4 °C; 40 x g; 5 min). Tento krok se opakuje dvakrát.

Po druhé centrifugaci jsme buněčnou peletu resuspendovali v kultivačním médiu (ISOM nebo Williams E) v laminárním boxu. Suspenzi jsme nalili do sterilních kyvet a znovu stočili v centrifuze (4 °C; 40 x g; 5 min). Poté jsme supernatant odstranili v laminárním boxu, peletu resuspendovali v kultivačním médiu a suspenzi jsme přelili do kádinky, kdy objem suspenze by měl být 50 nebo 100 ml.

Do mikroskopavky jsme jako vzorek odebrali 30 µl suspenze hepatocytů a přidali trypanovou modř v poměru 1:1. Počítáním v Bürkerově komůrce je určena koncentrace a viabilita hepatocytů. Buňky bez modrého zbarvení jsou brány jako živé, modré a deformované jsou počítány jako mrtvé. K výpočtu koncentrace buněk v 1 ml slouží vzorec:

$$c = x/3 * 2 * 10^4$$

c – počet buněk v 1 ml

x/3 – průměrný počet buněk napočítaných v 1 velkém čtverci komůrky

2 – ředění buněk

10⁴ – přepočet množství na 1 ml

4.2.1.3 Příprava a práce se sféroidy

100 µl suspenze hepatocytů o koncentraci 15 000 buněk/ml v suplementovaném médiu Williams E s 10 % fetálního hovězího séra (FBS) jsme nasadili do jamky 96-jamkové ULA destičky s kulatým dnem (složení média je uvedeno v **tab. 3**). Po nasazení jsme destičky centrifugovali (100 x g; 2 min). Během 4 dní došlo k agregaci buněk a vzniku sféroidů. Od 4. nebo 5. dne bylo každých 48–72 h odsáto 50 % média a nahrazeno novým médiem Williams E bez FBS. Médium odsáté během kultivace bylo zamrazeno. Pomocí dále popsané metody dot blot byla ve vzorcích média sledována produkce albuminu.

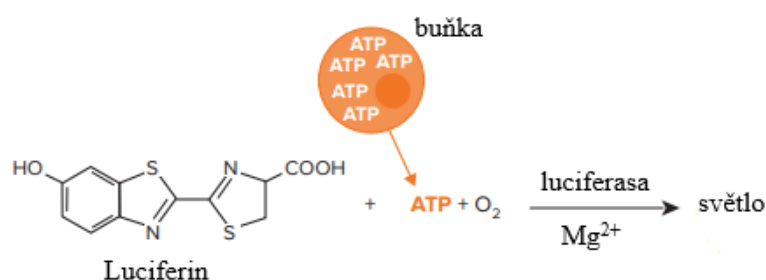
Tabulka 3 Složení média pro sféroidy

Williams E médium	500 ml
Penicilin/Streptomycin	100 U/ml / 100 µg/ml
L-glutamin	2 mM
Insulin	10 µg/ml
Transferin	5,5 µg/ml
Seleničitan sodný	6,7 ng/ml
Dexametason	100 nM
FBS	10 %

Připravené sféroidy byly inkubovány v kultivačním médiu s/bez lipogenních substrátů (např. směs mastných kyselin, amiodaron, fruktóza). Po ukončení inkubace jsme sféroidy buď odsáli, vložili do Trizolu a poté v nich stanovili expresi messengerové RNA (mRNA) vybraných biotransformačních enzymů nebo jsme u nich stanovili viabilitu pomocí měření hladiny ATP.

4.2.2 Stanovení viability sféroidů pomocí měření hladiny ATP

Stanovení hladiny ATP ve sféroidech bylo provedeno pomocí kitu CellTiter-Glo (Promega). Principem stanovení je, že luciferasa katalyzuje v přítomnosti ATP a kyslíku přeměnu luciferinu na oxyluciferin a tento proces je doprovázen emisí světla (**obr. 17**). Zdrojem ATP jsou živé buňky, takže vznikající luminiscence je přímo úměrná počtu živých buněk.



Obrázek 17 Princip stanovení viability sféroidů pomocí ATP (upraveno z (Itatani & Olsen, 2019).

Do dvou 96-jamkových ULA destiček se sféroidy jsme do každého sloupečku přidali lipogenní substráty dle **tab. 4** a inkubovali jsme je po dobu 7 a 14 dnů při teplotě 37 °C v atmosféře s obsahem 5 % CO₂. Médium s lipogenními substráty jsme měnili každý druhý den tak, že jsme vždy odsáli polovinu objemu média a nahradili ho novým médiem. Po ukončení inkubace jsme ULA destičky se sféroidy vyjmuli z inkubátoru a poté, co dosáhli pokojové teploty, jsme do každé jamky přidali 100 µl 3D činidla CellTiter-Glo na 100 µl média. Následně jsme destičky vložili do termostatu a nechali je při teplotě 25°C třepat po dobu 5 min, dalších 25 min jsme destičky inkubovali při teplotě 25°C bez třepání. Následně jsme změřili luminiscenci pomocí přístroje Tecan Infinite M200.

Tabulka 4 Obsah jednotlivých destiček

1. destička	složení	2. destička	složení
kontrola	médium	kontrola	médium
Mastné kyseliny (MK)	Kyselina olejová 200 µM, kyselina palmitová 100 µM	kontrola + INS	médium + insulin 1,72 nM
MK + citrát (CIT)	MK + citrát 150 µM	AMI	Amiodaron 10 µM
MK + CIT + fruktóza (FRU)	MK + citrát 150 µM + fruktóza 5 mM	AMI + INS	Amiodaron 10 µM + insulin 1,72 nM
MK +CIT + FRU + Glyc1	MK + citrát 150 µM + fruktóza 5 mM + glycerol 1 mM	MK + FRU + INS	MK + fruktóza 5 mM + insulin 1,72 nM
MK +CIT + FRU + Glyc2	MK + citrát 150 µM + fruktóza 5 mM + glycerol 2 mM	MK + INS	Kyselina olejová 200 µM, kyselina palmitová 100 µM + insulin 1,72 nM
MK + FRU + Glyc1	MK + fruktóza 5 mM + glycerol 1 mM	MK + FRU	MK + fruktóza 5 mM
MK + FRU + Glyc2	MK + fruktóza 5 mM + glycerol 1 mM	MK	Kyselina olejová 200 µM, kyselina palmitová 100 µM
Amiodaron (AMI)	Amiodaron 10 µM		

4.2.3 Stanovení proteinové exprese metodou dot blot

4.2.3.1 Detekce proteinů

Zásobní roztoky:

- *0,1 M TRIS pufr, pH 8,0* – 12,11 g TRISu jsme rozpustili v 800 ml redestilované vody. Upravili jsme pH na 8,0 pomocí 4 M HCl a doplnili roztok do 1 000 ml redestilovanou vodou.
- *TBST („Tris buffered saline with Tween“)* – 8,77 g NaCl jsme rozpustili v 300 ml redestilované vody. Přidali jsme 0,5 ml Tweenu 20 a 100 ml 0,1 M TRIS pufru o pH 8 a vše jsme doplnili v odměrné baňce do 1 000 ml.
- *5% roztok mléka v TBST* – 2,5 g sušeného mléka jsme rozpustili v 50 ml TBST.
- *Primární protilátka* – zásobní protilátku jsme naředili roztokem TBST s 1% hovězím sérovým albuminem (BSA).

protilátka proti albuminu – králičí, zředění 1:2000 (Abcam, ab207327)

- *Sekundární protilátka* – zásobní protilátku jsme naředili roztokem TBST s 1% BSA (popř. mlékem).

hovězí protilátka proti králičímu IgG konjugovaná s křenovou peroxidasou – zředění 1:10 000 (Santa Cruz Biotechnology, sc-2370)

Na zastříženou nitrocelulosovou membránu jsme nanесли ve formě kapek 2 μ l vzorků média. Poté jsme membránu pinzetou přenesli do plastové krabičky s víčkem a 3x opláchli redestilovanou vodou. Na membránu jsme nalili přibližně 25 ml roztoku 5% mléka v TBST a krabičku jsme umístili na kývačku. Po 2 hodinách jsme mléko slili, membránu opláchli redestilovanou vodou a nechali přes noc inkubovat s primární látkou.

Druhý den jsme primární látku slili a membránu opláchli roztokem TBST (4 x 15 min). Poté jsme inkubovali membránu se sekundární protilátkou s navázanou křenovou peroxidasou po dobu 1 h a po ní jsme membránu opět opláchli roztokem TBST (4 x 15 min).

V dalším kroku jsme z krabičky vylili roztok TBST a na povrch membrány napipetovali chemiluminiscenční substrát pro křenovou peroxidasu. Jako substrát jsme použili detekční činidlo od firmy Amersham (ECL Prime Western Blotting detection reagent), který obsahuje roztok luminolu a roztok peroxidu. Na membránu jsme použili 600 μ l luminolu a 600 μ l peroxidu. Membránu se substrátem jsme inkubovali po dobu 5 minut ve tmě a poté jsme provedli chemiluminiscenční detekci přístrojem Uvitec Alliance.

4.2.4 Stanovení exprese mRNA

4.2.4.1 Izolace RNA TRIzolou

Jedná se o proces, který se provádí v boxu určeném pro práci s ribonukleovou kyselinou (RNA). Do mikrozkušavek se sféroidy v Trizolu jsme přidali 100 μ l chloroformu. Zkušavky jsme protřepali v ruce po dobu cca 15 s, nechali je stát 2–3 minuty při pokojové teplotě a následně jsme je centrifugovali (4 °C; 12 000 x g; 15 min). Díky centrifugaci došlo k oddělení vodné a organické fáze. Horní vodná fáze obsahovala RNA, zatímco mezifáze a spodní fáze obsahovala proteiny a DNA.

Horní fázi jsme opatrně odpipetovali do nových mikrozkušavek a přidali 250 μ l isopropanolu. Mikrozkušavky jsme nechali stát po dobu 10 min a opět je zcentrifugovali (4 °C; 12 000 x g; 10 min). Následně jsme odstranili supernatant, k peletě RNA jsme přidali 1 ml 75 % ethanolu, zamíchali a znovu zcentrifugovali (4 °C; 7 500 x g; 5 min). Po odstranění supernatantu jsme peletu nechali usušit na vzduchu a poté ji dle velikosti pelety rozpustili ve 20–100 μ l vody ošetřené diethylpyrokarbonátem (DEPC).

4.2.4.2 Měření koncentrace a čistoty RNA

Po izolaci RNA následovalo změření koncentrace a čistoty RNA na přístroji NanoDrop. Jedná se o spektrofotometr, který umožňuje rychlou kvantifikaci/kvalifikaci vzorků DNA (deoxyribonukleová kyselina), RNA a proteinů v malých objemech vzorků (1–2 μ l) (García-Alegría et al., 2020).

Nejdříve jsme nastavili slepý vzorek (blank), kdy jsme na spodní kovový hrot přístroje nanесли 2 μ l vody. Po otření jsme na hrot nanášeli 2 μ l vzorků a měřili jsme jejich absorbance.

Důležitými údaji k vyhodnocení čistoty vzorků DNA/RNA jsou kontaminace proteiny a kontaminace fenolem. O kontaminaci proteiny informuje poměr absorbancí A260/280, který by měl být větší než 1,8. Naopak o kontaminaci fenolem informuje poměr absorbancí A260/230. Ten by se měl blížit k hodnotě 2.

4.2.4.3 Ošetření vzorků DNAsou

Principem této metody je odstranění případné kontaminace vzorků genomovou DNA.

Zásobní roztoky:

- *0,5M EDTA s pH 8,0*: 18,61 g ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) jsme smíchali s cca 80 ml redestilované vody ošetřené DEPC. Postupně jsme přidali NaOH, dokud pH nedosáhlo hodnoty 8,0. Po rozpuštění EDTA jsme roztok doplnili vodou do 100ml.
- *0,1M EDTA s pH 8,0*: Zásobní roztok 0,5M EDTA jsme zředili redestilovanou vodou v poměru 1:4.

Do mikrozkušavek jsme napipetovali 17 μ l vzorku a 3 μ l zředěné DNAsy, která byla naředěna puforem (DNase buffer) v poměru 1:2. Směsi jsme promíchali na vortexu, stočili a nechali inkubovat v termomixeru Eppendorf při 37 °C po dobu 25 min (s třepáním 500 rpm). Poté jsme mikrozkušavek přidali 1 μ l 0,1 M EDTA a znovu je inkubovali při 75 °C po dobu 10 min, kdy dojde k inaktivaci DNAsy. Nakonec jsme ke vzorkům přidali DEPC vodu, jejíž potřebný objem jsme vypočítali podle koncentrace RNA zjištěné v předchozím kroku, aby výsledný objem směsi byl 50 μ l. Takto ošetřená RNA o koncentraci 0,05 μ g/ μ l je připravená na reverzní transkripci. Vzorky jsou uchovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

4.2.4.4 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, kdy dochází k přepisu RNA na jednořetězcovou komplementární DNA (cdNA) za použití enzymu reverzní transkriptasy (RT). Reverzní transkriptasa je RNA-dependentní DNA-polymerasa.

Nejdříve jsme do mikrozkušavek napipetovali směs 1 μ l náhodných hexamerů a 5 μ l RNA vzorků. Připravili jsme dvě paralelní sady vzorků – jedna s reverzní

transkriptasou a druhá bez reverzní transkriptasy jako kontrola. Takto připravené směsi jsme sklepli, zamíchali na vortexu a stočili ve stolní centrifuze. Poté jsme mikrozkušavky vložili do PCR cykléru, kde se zahřívají na 65 °C po dobu 5 min. Následně jsme vzorky dali do mrazícího stojánku a opět stočili.

K ochlazeným vzorkům jsme napipetovali 14 µl mastermixu. Mastermixy jsme připravili podle následující tabulky (množství se násobí počtem vzorků +2).

Tabulka 5 Složení mastermixů na jeden vzorek

	s RT	bez RT
reakční pufr 5x	4 µl	4 µl
DTT	2 µl	2 µl
dNTPs	2 µl	2 µl
RT	0,5 µl	-
H ₂ O	5,5 µl	6 µl

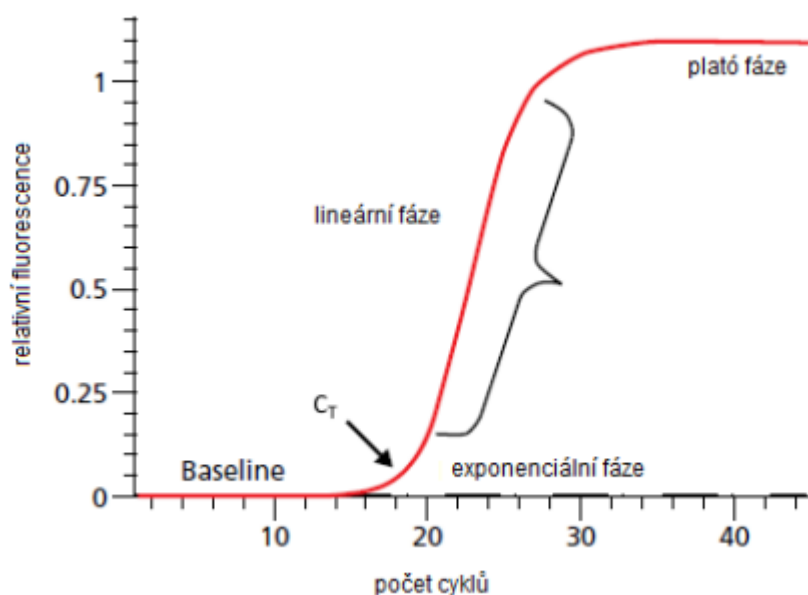
Směs jsme důkladně promíchali a znovu vložili do PCR cykléru, kdy podle přednastaveného protokolu docházelo ke změnám teplot: 50 min při 42 °C, kdy dochází k syntéze cDNA, poté se vzorky inkubují po dobu 5 min při 80 °C, kdy dochází k denuraci reverzní transkriptasy. Po reakci jsme ke vzorkům přidali 80 µl redestilované vody a uložili je do mrazáku na -20 °C.

4.2.4.5 Real-time PCR (qPCR, kvantitativní PCR v reálném čase)

Tato metoda je založena na polymerasové řetězové reakci (PCR). U klasické PCR dochází k detekci amplifikovaného produktu elektroforeticky až po ukončení reakce. Zatímco u real-time PCR je možné měřit zmožený produkt v průběhu reakce, tzn. v reálném čase (real time). K detekci produktů se využívají fluorescenční molekuly, které odpovídají množství amplifikované DNA v každém cyklu. Mohou to být barviva vázající se na DNA (např. SYBR Green I) nebo sekvenčně specifické primery či sondy (např. Molecular Beacon, TaqMan) (Dudová & Hájek, 2008). Intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi.

Grafickým záznamem je zobrazení fluorescenčního signálu v závislosti na počtu cyklů, tzv. amplifikační křivka (**obr. 17**). Zpočátku je detekován pouze malý fluorescenční signál (baseline). V exponenciální fázi dochází k exponenciálnímu růstu množství amplikonů a tím i fluorescence. Následně v plató fázi se již množství

amplikonů nemění a intenzita fluorescence je konstantní, jelikož systém je již nasycen. Důležitým bodem křivky je C_t hodnota (threshold cycle). Hodnota udává číslo cyklu, ve kterém intenzita fluorescence překročí prahovou hodnotu detekce. Platí, že čím vyšší je počáteční koncentrace templátu v reakční směsi, tím dříve je detekována zvyšující se fluorescence produktu a tím nižší je hodnota C_t (Dudová & Hájek, 2008; Tomanová, 2015).



Obrázek 18 Standardní amplifikační křivka (převzato z (Tomanová, 2015))

V rámci této diplomové práce jsme stanovovali expresi tří vybraných genů, které kódují biotransformační enzymy cytochrom P450 1A1/2 (CYP1A1/2), cytochrom P450 3A (CYP3A) a NAD(P)H:chinonoxidoreductasu 1 (NQO1). Jako referenční gen byla použita glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH). Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v **tabulce 6**.

Tabulka 6 Použité primery

Gen	Forward primer	Reverse primer
CYP1A1/2	GAGTCAGCAGTATGGGGACG	GCCTGCTTGATGGTGTTCAG
CYP3A	GCCCTTTGGAAATGGACCCA	TGCAGAACTTTAGTGAGAGCGA
GAPDH II	GCAACTCCCATTCTTCCACC	CCACCACCCTGTTGCTGTAG
NQO1	TTCCAGCCGACAACCAGATC	AGCCTCCTCCTTTTCCTATCCT

Nejdříve jsme připravili do 0,5 ml mikrozkušavek mastermixy pro jednotlivé geny (tab. 7).

Tabulka 7 Reakční směs pro PCR

Složení	na 1 jamku
redestilovaná voda	4,2 μ l
2x SG Mix*	10,0 μ l
Forward + Reverse primer (5 μ M)	0,8 μ l

*2x SG Mix = obsahuje SYBR Green I, DNA polymerasu, dinukleotidtrifosfáty, pufr

Měření každého vzorku jsme prováděli v duplikátech. Ke každému vzorku i k negativní kontrole (bez templátové cDNA) jsme přidali 15 μ l mastermixu.

Do jednotlivých jamek 96-jamkové PCR destičky jsme pipetovali 15 μ l mastermixu. Do jamky negativní kontroly jsme místo vzorku napipetovali 5 μ l vody. Destičku jsme poté zalepili speciální folií, promíchali na vortexu, stočili v centrifuze, vložili do PCR cykléru Quant Studio 6 a spustili program. Získaná data jsou pak exportována jako tabulka do programu MS Excel. Ke kvantitativnímu hodnocení jsme použili následující vzorec:

„comparative Ct“: $2^{(-\Delta Cq)}$ ($\Delta Cq = Cq(TG) - Cq(RG)$), kde TG představuje cílový gen a RG referenční gen.

4.2.5 Statistické hodnocení dat

Viabilita sféroidů byla měřena v tetraplikátech, stanovení exprese mRNA v biologických duplikátech. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Statistické hodnocení rozdílů ve viabilitě sféroidů bylo provedeno pomocí nepárového t-testu s Welchovou korekcí, zatímco porovnání exprese mRNA v čase bylo provedeno pomocí one-way ANOVA s Dunnettovým post-hoc testem za použití GraphPad Prism 9.4 (GraphPad Software). Rozdíly byly považovány za významné, když $p < 0,05$ a jsou v grafu označeny "**".

5. VÝSLEDKY

5.1 Izolace hepatocytů

Klíčovým krokem v přípravě sféroidů je získání suspenze izolovaných hepatocytů s dostatečnou viabilitou. Od začátku experimentální práce jsme se potýkali s potížemi při izolaci hepatocytů, proto jsme se snažili tuto metodu optimalizovat. V **tab. 8** můžeme vidět shrnutí izolace hepatocytů. Ve většině případů byla viabilita hepatocytů příliš nízká, a tak se ani nenasazovaly do ULA destiček. K tvorbě sféroidů se přistupovalo, pokud byla viabilita hepatocytů po izolaci alespoň 60% (v případě více jaterních laloků, jsme nasazovali do destiček hepatocyty s nejvyšší viabilitou).

Tabulka 8 Výsledky izolace hepatocytů

Izolace č.	Pohlaví	Lalok č.	Kolagenasa (množství)	Promývání (min)	Inhibitor (množství)	Viabilita (%)	Sféroidy
1	♀	1	Gibco (30 mg)	3	---	20	ne
		2	Gibco (26,5 mg)	4,5	---	nízká	ne
2	♂	1	Gibco (30,5 mg)	4,5	---	60	ano
		2	Gibco (30,4 mg)	3,75	---	nízká	ne
		3	Gibco (31,2 mg)	4,25	---	nízká	ne
3	♂	1	Gibco (30,05 mg)	5,75	---	63	ne
		2	Gibco (35,01 mg)	5	---	67	ano
		3	Gibco (28,0 mg)	5	---	55	ne
4	♂	1	Kolagenasa II (27,52 mg)	4	6,73 mg	60	ano

		2	Kolagenasa II (26,8 mg)	3,75	7,1 mg	50	ne
5	♂	1	Kolagenasa IV (27,34 mg)	3,75	7,41 mg	50	ne
		2	Kolagenasa (26,2 mg)	3,75	6 mg	52	ne
6	♂	1	Kolagenasa II (25,02 mg)	3,25	5,97 mg	57	ne
		2	Kolagenasa IV (26,31 mg)	4,25	6,8 mg	43	ne
7	♂	1	Kolagenasa II (16,95 mg)	6,25	1,8 mg	<50	ne
		2	Kolagenasa II (20,35 mg)	7,45	---	<40	ne
8	♂	1	Kolagenasa II (28,2 mg)	3	80 µl	50	ne
		2	Kolagenasa II (28,4 mg)	3	80 µl	nízká	ne

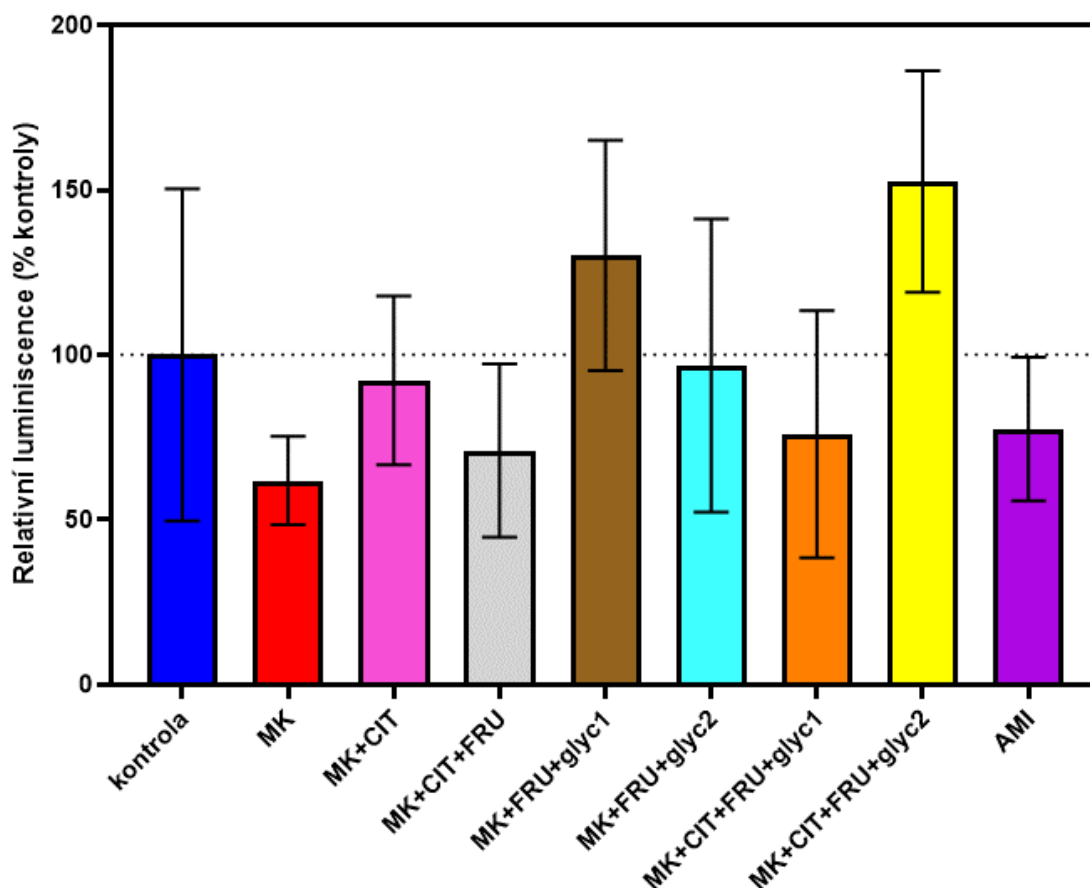
5.2 Určení viability sféroidů pomocí měření ATP

Vytvořené sféroidy byly ovlivněny různými lipogenními substráty (např. směs mastných kyselin, fruktóza, glycerol, amiodaron) a jejich kombinacemi s cílem indukovat v nich metabolické změny podobné nealkoholové tukové chorobě jater. K některým sféroidům byl přidán insulin k podpoření anabolických reakcí. Sféroidy byly inkubovány po dobu 7 a 14 dní při 37 °C, přičemž výměna média probíhala každý druhý den. Viabilita sféroidů byla hodnocena pomocí hladin ATP, které je nezbytné pro život každé buňky i celého organismu a jeho koncentrace klesá po smrti organismu. Absolutní hodnoty luminiscence, která odpovídá hladině ATP jsou prezentovány v tabulce 9 a 10. Z **obr. 19** je patrné, že po 7 dnech inkubace nedošlo vlivem lipogenních substrátů k zásadním změnám v hladinách ATP, zatímco při inkubaci sféroidů po dobu 14 dnů došlo vlivem amiodaronu samotného a kombinace lipogenních substrátů s insulinem k signifikantnímu poklesu jejich viability (**obr. 20**).

Mezi kontrolou inkubovanou v přítomnosti a nepřítomnosti insulinu není významný rozdíl ve viabilitě.

Tabulka 9 Vliv lipogenních substrátů na viabilitu sféroidů (7 dní). Sféroidy byly s lipogenními substráty inkubovány po dobu 7 dní při 37°C. Viabilita sféroidů byla stanovena pomocí luminiscenčního stanovení hladiny ATP. Data jsou prezentována jako průměr luminiscencí ± SD (n=4).

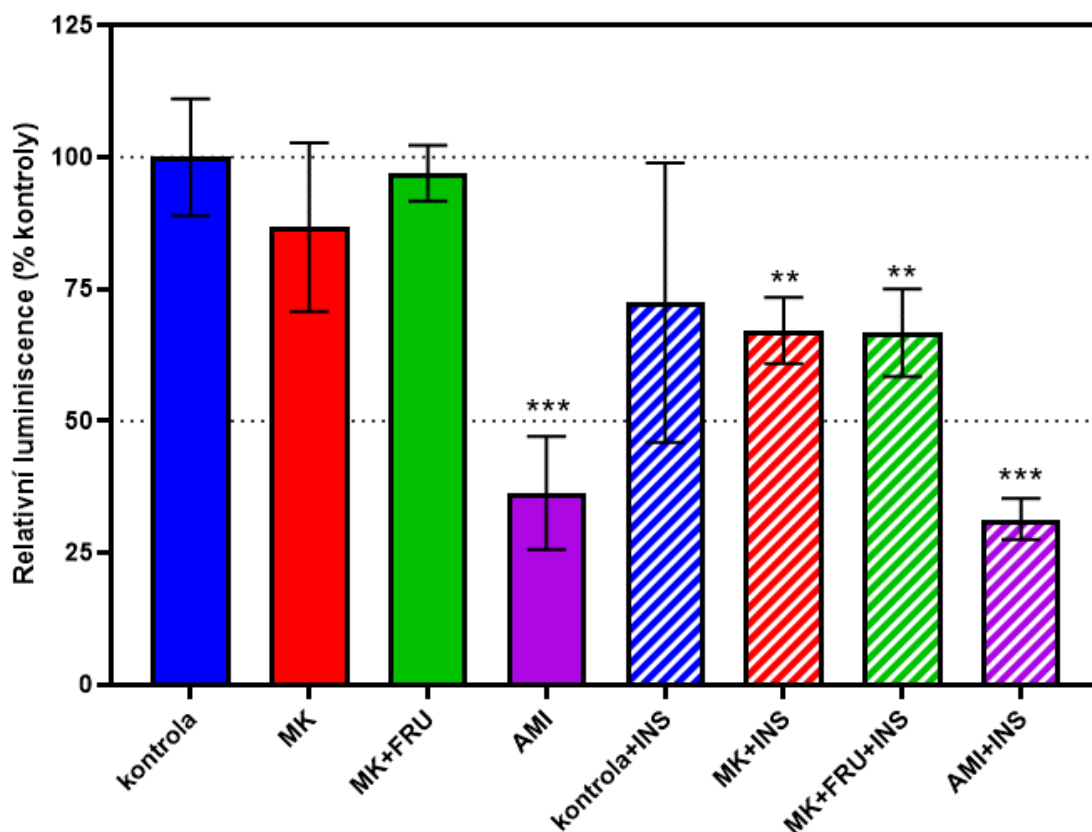
Lipogenní substrát	Relativní luminiscence	Směrodatná odchylka	p-hodnota
Kontrola	106.591,5	53.648,2	---
Mastné kyseliny 300 μM	65.923,3	14.255,8	0,2282
Mastné kyseliny 300 μM + citrát 150 μM	98.320,5	27.284,6	0,7957
Mastné kyseliny 300 μM + citrát 150 μM + fruktóza 5 mM	75.666,3	28.015,1	0,3583
Mastné kyseliny 300 μM + fruktóza 5 mM + glycerol 1 mM	138.758,5	37.284,0	0,4743
Mastné kyseliny 300 μM + fruktóza 5 mM + glycerol 2 mM	103.129,8	47.428,6	0,1405
Mastné kyseliny 300 μM + citrát 150 μM + fruktóza 5 mM + glycerol 1 mM	80.923,0	39.995,2	0,3672
Mastné kyseliny 300 μM + citrát 150 μM + fruktóza 5 mM + glycerol 2 mM	162.594,5	35.866,5	0,9262
Amiodaron 10 μM	82.579,5	23.239,9	0,4566



Obrázek 19 Vliv lipogenních substrátů na viabilitu sféroidů (7 dní). Sféroidy byly inkubovány se směsí mastných kyselin (300 μM), citrátu (150 μM), fruktózy (5 mM), glycerolu (1 a 2 mM) nebo amiodaronu (10 μM) po dobu 7 dní při teplotě 37°C. Viabilita sféroidů byla stanovena pomocí luminiscenčního stanovení hladiny ATP. Data jsou prezentována jako průměr \pm SD ($n=4$). Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, nepárový t-test s Welchovou korekcí). MK, mastné kyseliny; CIT, citrát; FRU, fruktóza; glyc, glycerol; AMI, amiodaron.

Tabulka 10 Vliv lipogenních substrátů na viabilitu sféroidů (14 dní). Sféroidy byly s lipogenními substráty inkubovány po dobu 14 dní při 37°C. Viabilita sféroidů byla stanovena pomocí luminiscenčního stanovení hladiny ATP. Data jsou prezentována jako průměr luminiscencí ± SD (n=4).

Lipogenní substrát	Relativní luminiscence	Směrodatná odchylka	p-hodnota
Kontrola	175.830,8	19.475,8	---
Mastné kyseliny 300 μM	152.463,0	28.070,3	0,2260
Mastné kyseliny 300 μM + fruktóza 5 mM	170.532,8	9.317,5	0,6476
Amiodaron 10 μM	63.920,7	18.805,8	0,0002
Kontrola + insulin 1,72 nM	127.371,8	46.530,6	0,1267
Mastné kyseliny 300 μM + insulin 1,72 nM	118.077,3	11.008,1	0,0042
Mastné kyseliny 300 μM + fruktóza 5 mM + insulin 1,72 nM	117.309,3	14.600,4	0,0037
Amiodaron 10 μM + insulin 1,72 nM	55.169,0	6.872,4	0,0004



Obrázek 20 Vliv lipogenních substrátů na viabilitu sféroidů (14 dní). Sféroidy byly inkubovány se směsí mastných kyselin (300 μ M), fruktózy (5 mM) a amiodaronu (10 μ M) v přítomnosti/nepřítomnosti insulinu (100 pM) po dobu 14 dní při teplotě 37°C. Viabilita sféroidů byla stanovena pomocí luminiscenčního stanovení hladiny ATP. Data jsou prezentována jako průměr \pm SD (n=4). Skupiny označené * se významně liší od kontroly (** p < 0,01, *** p < 0,001, nepárový t-test s Welchovou korekcí).

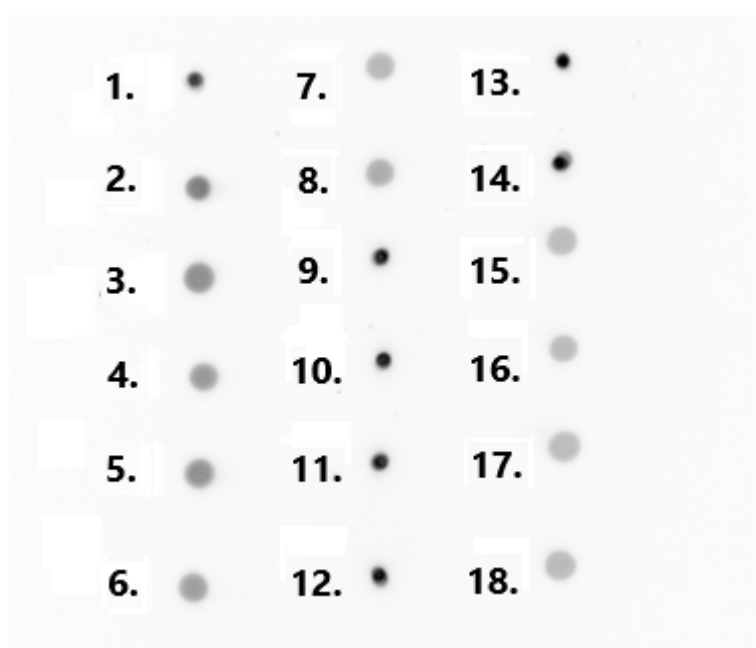
MK, mastné kyseliny; FRU, fruktóza; AMI, amiodaron; INS, insulin 1,72 nM

5.3 Ověření syntetické funkce jaterních sféroidů

Pomocí metody dot blot jsme zjišťovali, zda námi vytvořené jaterní sféroidy mají syntetickou aktivitu. Zjistili jsme, že sféroidy jsou schopny vytvářet albumin (**obr. 21**), který byl pomocí metody dot blot stanoven v kultivačním mediu, a model je tedy funkční. Na **obr. 21** můžeme vidět, že v přítomnosti mastných kyselin vznikaly světlejší (méně syté) a větší skvrny, než v přítomnosti amiodaronu či v kontrolních sféroidech. Schéma nanášení na membránu je uvedeno v **tabulce 11**.

Tabulka 11 Schéma pipetování dot blotu. Vzorky 1–10 byly inkubovány 7 dní a vzorky 11–18 po dobu 14 dní.

1.kontrola	7. MK + FRU + 1 mM glycerol	13. AMI
2.MK	8. MK + FRU + 2 mM glycerol	14. AMI + INS
3.MK + CIT	9. AMI (10 mM)	15. MK + FRU + INS
4.MK + CIT + FRU	10. kontrola + homogenát ze sféroиду	16. MK + INS
5.MK + CIT + FRU + 1 mM glycerol	11. kontrola	17. MK + FRU
6.MK + CIT + FRU + 2 mM glycerol	12. kontrola + insulin (INS) (1,72 mM)	18. MK

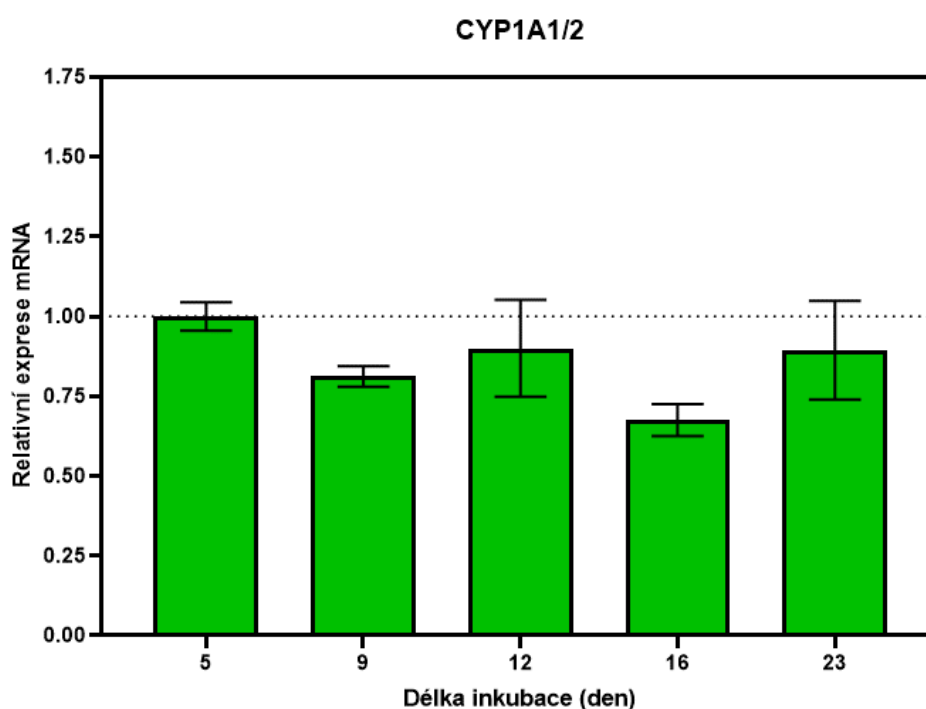


Obrázek 21 Dot blot analýza albuminu v kulturačním médiu odebraném od jaterních sféroïdů inkubovaných po dobu 7 či 14 dnů v přítomnosti lipogenních substrátů.

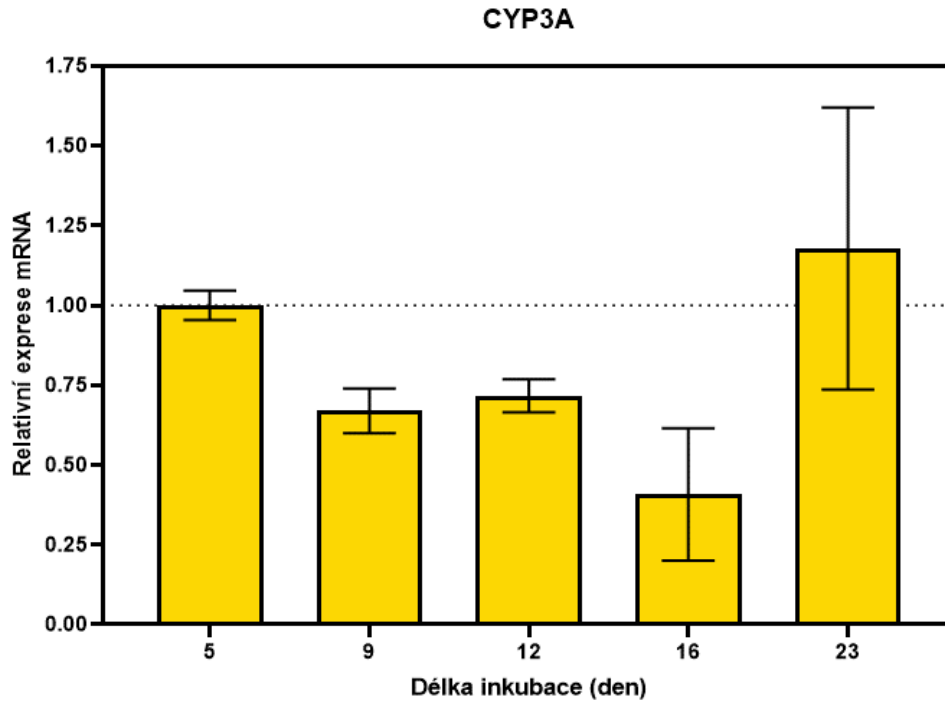
5.4 *Expresa mRNA v jaterních sféroïdech*

V prvním kroku jsme určovali počet sféroïdů, který je nezbytný pro získání dostatečného množství RNA pro další experimenty. Nejprve jsme použili 1 či 2 sféroïdy, ale z nich se nám nepodařilo vyizolovat dostatečné množství RNA.

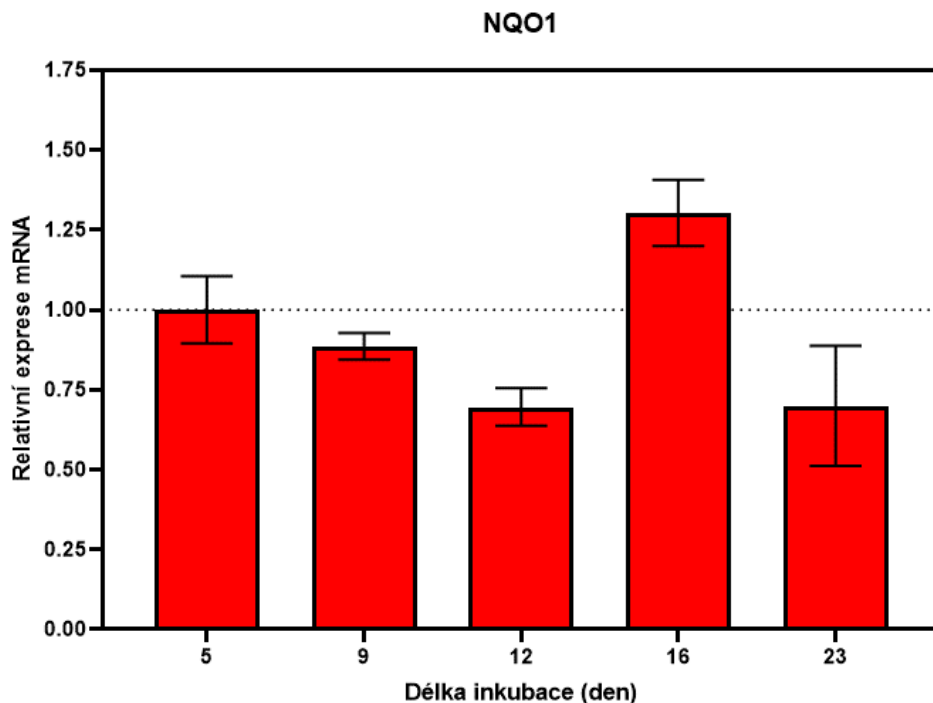
Poté jsme izolovali RNA ze 6 sférooidů a zde už bylo získáno dostatečné množství RNA, a proto jsme mohli stanovit expresi mRNA námi vybraných genů kódujících biotransformační enzymy. Stanovovali jsme expresi mRNA genů CYP1A1/2, CYP3A a NQO1 a jako referenční gen jsme použili GAPDH. Výsledky jsou shrnuty v **obr. 22–24**. Z nich je patrné, že exprese sledovaných genů není stálá, v průběhu inkubace kolísá, přesto nebyla pomocí zvolené statistické metody nalezena žádná signifikantní změna v expresi mRNA, jak bychom si přáli a jak měli v literatuře.



Obrázek 22 Exprese genu CYP1A1/2 v jaterních sféroidech v průběhu dlouhodobé inkubace. Sféroidy byly inkubovány po dobu 23 dní při teplotě 37°C. Data jsou prezentována jako průměr \pm SD ($n=2$). Skupiny označené * se signifikantně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA).



Obrázek 23 Exprese genu CYP3A v jaterních sféroidech v průběhu dlouhodobé inkubace. Sféroidy byly inkubovány po dobu 23 dní při teplotě 37°C. Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n=2). Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA).



Obrázek 24 Exprese genu NQO1 v jaterních sféroidech v průběhu dlouhodobé inkubace. Sféroidy byly inkubovány po dobu 23 dní při teplotě 37°C. Data jsou prezentována jako průměr ± SD (n=2). Skupiny označené * se významně liší od kontroly ($p < 0,05$, jednocestná ANOVA).

6. DISKUSE

Játra jsou životně důležitým orgánem, který zajišťuje syntézu, metabolismus a detoxikaci, ale jaterní onemocnění a poškození jater vyvolaná léky mohou vážně narušit jejich funkce. V rámci preklinického a klinického hodnocení léčiv mají v současnosti nezastupitelnou roli různé jaterní *in vitro* modely. Za zlatý standard mezi jaterními *in vitro* systémy využívanými při studiu biologie a funkce jater, hepatotoxicity vyvolané léky a onemocnění jater jsou v současnosti považovány primární lidské hepatocyty. Při kultivaci primárních hepatocytů v konvenčních 2D jednovrstvých kulturách však dochází k jejich dediferenciaci a rychlé ztrátě funkcí specifických pro hepatocyty. Pro dlouhodobé studie a testy, které vyžadují zachované specifické jaterní funkce, jsou tyto kultury obtížně využitelné (Bell et al., 2016; Elaut et al., 2006; Kozyra et al., 2018; Vorrink et al., 2017).

Pro udržení fyziologických funkcí hepatocytů jsou důležité interakce buňka-buňka a buňka-ECM v mikroprostředí tkáně. Ve snaze napodobit toto mikroprostředí byly vyvinuty různé složitější kultivační systémy, jako jsou sendvičové kultury a 3D modely založené na přítomnosti opěrného systému či bioreaktory. Mezi hlavní nevýhody těchto systémů patří potíže s manipulací, vazba léčiv na molekuly opěrného systému a rozdíly mezi šaržemi substrátů ECM, které ovlivňují reprodukovatelnost výsledků. *In vitro* systémem, který těmto problémům předchází, jsou 3D kultury primárních hepatocytů, nazývané jaterní sféroidy. Bylo prokázáno, že primární hepatocyty kultivované ve formě sféroidů si po delší dobu udržují stabilní viabilitu a produkci esenciálních molekul, jako jsou albumin a močovina. Dále bylo popsáno, že buňky jsou ve sféroidech polarizované a tvoří funkční žlučovody (Godoy et al., 2013; Ohkura et al., 2014).

Použití hepatocytů, které exprimují funkce specifické pro játra, je klíčové pro vývoj umělých jater. Ukázalo se, že zařízení na podporu jater při jejich kritickém selhání, jako jsou plazmaferéza nebo ultrafiltrační techniky, významně nezlepšily jejich přežití. Ztráta specializovaných jaterních funkcí (dediferenciaci) je bohužel stále velkým problémem. Ke zlepšení/udržení specifických funkcí hepatocytů v *in vitro* kulturách byly použity různé přístupy, jako jsou tvorba multicelulárních sféroidů nebo ko-kultivace hepatocytů s ECM. Ambrosino et al. (2015) se zabývali porovnáním dvou různých modelů izolovaných hepatocytů v kultuře: izolovanými hepatocyty a jaterními

sféroidy (60 % hepatocytů, 40 % neparenchymálních buněk a extracelulární matrix). Pro testování funkční aktivity hepatocytů testovali produkci albuminu a biotransformaci diazepam (katalyzována zejména CYP3A4 a CYP2C19). Jaterní sféroidy vykazovaly vysokou sekreci albuminu, zatímco u izolovaných hepatocytů byla jeho produkce nižší a v průběhu inkubace (30 dní) postupně klesala. Zároveň byly ve sféroidech nalezeny vyšší hladiny metabolitů diazepamínu než v izolovaných hepatocytech, a to v průběhu celé inkubace (21 dnů). Studie tedy ukázala, že izolované hepatocyty si udržují svou funkční aktivitu po dobu výrazně kratší ve srovnání s jaterními sféroidy (Ambrosino et al., 2005).

I když existuje řada metod pro generování 3D sféroidů, zdá se, že různé buněčné linie reagují odlišně, i přesto že jsou kultivovány stejnou metodou. Například MCF7 buňky tvoří těsné 3D sféroidy, za použití destiček potaženými poly-HEMA, zatímco SKBR3 buňky tvoří pouze volné agregáty (Ivascu & Kubbies, 2006). Buesch et al. (2019) porovnávali různé systémy pro kultivaci primárních lidských hepatocytů (sendvičová kultura, sféroidy v destičkách pro sféroidy a v ULA destičkách s kulatým či kónickým dnem, sféroidy vytvořené metodou visící kapky) a sledovali jejich viabilitu a metabolickou funkci po dobu 28 dní. Sféroidy kultivované v ULA destičkách s kulatým dnem a připravené metodou visící kapky byly srovnatelné, vytvářely žlučové kanálky, syntetizovaly albumin a zachovávaly si aktivitu biotransformačních enzymů (např. CYP1A2, CAP2B6 a CYP3A4). Nicméně mezi sféroidy od různých dárců byly pozorovány rozdíly ve viabilitě i metabolických funkcích během dlouhodobé inkubace (Buesch et al., 2019).

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu přípravy jaterních sféroidů. K těmto účelům byly použity hepatocyty izolované z jater samců a samic potkana kmene Wistar. Aby mohly buňky vytvářet agregáty v suspenzi, je potřeba tyto buňky kultivovat ve stavu, který neumožňuje jejich přilnutí k pevnému povrchu. V této práci byla pro přípravu jaterních sféroidů použita metoda „*forced-floating*“ za použití kultivačních destiček s velmi nízkou adhezivitou (ULA destičky s kulatým dnem). Tato metoda patří spolu s metodou visící kapky mezi dvě nejčastěji používané metody pro 3D sféroidy. Porovnáním buněčného chování v těchto dvou metodách se zabývala studie pod vedením Amarala et al. (2017). Dle výsledků došli k závěru, že metoda „*forced-floating*“ za použití ULA destiček je vhodnější a jednodušší metoda pro generování sféroidů pro screening léčiv/ testování cytotoxicity (Amaral et al., 2017).

V současné době je celosvětově nejčastějším jaterním onemocněním nealkoholová tuková choroba jater (NAFLD). Jedná se o spektrum jaterních onemocnění začínajících od prosté steatózy, přes steatohepatitidu (NASH), která může dále vést k fibróze, cirhóze a hepatocelulárnímu karcinomu. Možnosti léčby NAFLD jsou omezené, což je alespoň částečně způsobeno nedostatkem spolehlivých lidských *in vitro* modelů onemocnění (Ingelman-Sundberg & Lauschke, 2022). Kozyra et al. (2018) zavedli 3D *in vitro* model NAFLD za použití sféroidů připravených z lidských primárních hepatocytů, který lze využít k testování nových léčiv. Jaterní steatóza byla indukována u sféroidů, které byly ovlivněny volnými mastnými kyselinami, monosacharidy a insulinem. Volné mastné kyseliny a také kombinace insulinu a monosacharidů podporovaly hromadění lipidů v hepatocytech a zvýšenou expresi lipogenních genů (např. synthasy mastných kyselin). Toto prostředí také podpořilo rozvoj insulinové rezistence, což se projevilo zvýšením markerů glukogenní a insulinové rezistence, které jsou pozorovány u diabetes mellitus 2. typu a metabolického syndromu. Po vysazení lipogenních substrátů a po léčbě různými antisteatotickými sloučeninami, jako je metformin nebo olaparib, byla indukovaná steatóza reverzibilní (Kozyra et al., 2018).

V této diplomové práci jsme sledovali vliv různých lipogenních substrátů (MK, fruktóza, amiodaron¹) na viabilitu potkaních sféroidů. V našem experimentu byla viabilita sféroidů hodnocena pomocí hladin ATP. Z výsledků je patrné, že po 7 dnech inkubace nedošlo vlivem lipogenních substrátů k zásadním změnám v hladinách ATP, zatímco při inkubaci sféroidů po dobu 14 dnů došlo vlivem amiodaronu samotného a kombinace lipogenních substrátů s insulinem k významnému poklesu jejich viability. Podobných výsledků dosáhli Bell et al. (2016), kteří sledovali viabilitu sféroidů z primárních lidských hepatocytů ovlivněným amiodaronem a zjistili, že při použití 10 μM amiodaronu došlo k významnému snížení viability již po 7 dnech inkubace. Lze tedy říct, že 3D jaterní sféroidy mohou sloužit jako cenný, kompatibilní model pro studium lékového poškození jater a jaterní steatózy *in vitro* (Bell et al., 2016).

Funkčním markerem hepatocytů i jaterních sféroidů je protein albumin, který jaterní hepatocyty secernují do plasmy. Ve studii Kozyra et al. (2018) si jaterní sféroidy kultivované po dobu 14 dní za patologických podmínek (mastné kyseliny 320 μM a

¹ Amiodaron vyvolává v jaterních buňkách mikrovesikulární steatózu a lze ho tedy využít jako modelovou látku k indukci NAFLD v *in vitro* modelech.

insulin) udržely schopnost syntetizovat albumin a nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi množstvím albuminu produkovaného kontrolními sféroidy (176 ± 17 ng/ml) a sféroidy kultivovanými za patologických podmínek (220 ± 38 ng/ml). V námi připravených potkaních sféroidech, které byly inkubovány s lipogenními substráty byla rovněž zachována schopnost produkovat albumin po celou dobu inkubace (7 a 14 dní). Jeho produkci jsme sledovali v kultivačním médiu pomocí metody dot blot (Kozyra et al., 2018).

Dále jsme také stanovovali expresi mRNA genů CYP1A1/2, CYP3A a NQO1 a jako referenční gen jsme použili GAPDH. Z našich výsledků je patrné, že exprese sledovaných genů nebyla stálá, v průběhu inkubace kolísala, přesto nebyla pomocí zvolené statistické metody nalezena žádná signifikantní změna v expresi mRNA. Vorrink et al. (2017) sledovali mRNA expresi hlavních biotransformačních enzymů (pěti isoform CYP, dvou isoform UDP-glukuronosyltransferasy a glutathion-S-transferasy P) ve 3D sféroidech z lidských primárních hepatocytů. Exprese mRNA CYP2C8, CYP2C9 a CYP2D6 zůstala po celou dobu inkubace stabilní, zatímco exprese CYP1A2 a CYP3A4 byla po celou dobu inkubace upregulovaná (Vorrink et al., 2017).

Rychlý nárůst počtu studií naznačuje, že novým zlatým standardem mezi 3D systémy *in vitro* kultivace jater by se mohly stát jaterní sféroidy. Potřebná je však standardizace protokolů a metod. 3D buněčné kultury jsou stále se vyvíjejícím oborem, který vyžaduje další výzkum pro jejich optimalizaci.

7. ZÁVĚR

Výsledky experimentální části mohou být shrnuty do následujících bodů:

- Během experimentální práce se nám podařilo vyizolovat jen malé množství hepatocytů s dostatečnou viabilitou k následnému vytvoření sféroidů, jelikož ve většině případů byla viabilita hepatocytů příliš nízká (potřebnou viabilitu jsme stanovili na alespoň 60 %).
- U námi vytvořených sféroidů jsme ověřovali jejich viabilitu měřením produkce ATP. Sféroidy byly ovlivněny různými lipogenními substráty (např. směs mastných kyselin, fruktóza, amiodaron) a jejich kombinacemi, dále byla u některých sféroidů zvýšena koncentrace insulínu v kultivačním médiu. Při inkubaci sféroidů po dobu 7 dnů nedošlo k zásadním změnám v hladinách ATP, zatímco při inkubaci sféroidů po dobu 14 dnů došlo vlivem amiodaronu samotného a kombinace lipogenních substrátů s insulínem k signifikantnímu poklesu jejich viability, a to až o 68,6 %.
- Pomocí metody dot blot jsme zjistili, že námi vytvořené sféroidy mají syntetickou aktivitu a jsou schopny produkovat albumin do kultivačního média.
- Jako optimální počet sféroidů, který je dostatečný pro izolaci RNA, jsme určili šest sféroidů. V případě 1–2 sféroidů nebylo vyizolováno dostatečné množství RNA.
- Z výsledků exprese mRNA genů CYP1A1/2, CYP3A a NQO1 vyplývá, že přestože jejich exprese během inkubace nebyla stálá, a kolísala, nebyla nalezena žádná signifikantní změna v expresi mRNA.

8. POUŽITÉ ZKRATKY

2D	dvourozměrný
3D	trojrozměrný
AMI	amiodaron
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
Ca ²⁺	vápenaté ionty
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CIT	citrát
CYP	cytochrom P450
DEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidy
DTT	dithiotreitol
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylenglykol-bis(2-aminoethyl)-tetraoctová kyselina
FBS	fetal bovine serum (fetální hovězí sérum)
FRU	fruktóza
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
Gly	glycin
HPCs	hepatic progenitor cells (jaterní progenitorové buňky)

INS	insulin
MCS	multicellular spheroid (multicelulární sféroid)
MK	mastné kyseliny
mRNA	messengerová RNA
NAFLD	nealkoholová tuková choroba jater
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa 1
PBS	phosphate buffered saline (fosfátem pufovaný solný roztok)
PCLS	precision-cut liver slices (ultratenké jaterní řezy)
PCR	polymerase chain reaction (polymerasová řetězová reakce)
poly-HEMA	polyhydroxyethylmethakrylát
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzní transkriptáza
TBST	„Tris buffered saline with Tween“
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULA	„ <i>ultra-low attachment</i> “ destičky

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Shrnutí výhod a nevýhod modelových systémů jater	23
Tabulka 2 Shrnutí výhod a nevýhod jednotlivých typů příprav sféroidů	34
Tabulka 3 Složení média pro sféroidy	41
Tabulka 4 Obsah jednotlivých destiček	42
Tabulka 5 Složení mastermixů na jeden vzorek	46
Tabulka 6 Použité primery	47
Tabulka 7 Reakční směs pro PCR	48
Tabulka 8 Výsledky izolace hepatocytů	49
Tabulka 9 Vliv lipogenních substrátů na viabilitu sféroidů (7 dní).....	51
Tabulka 10 Vliv lipogenních substrátů na viabilitu sféroidů (14 dní).....	53
Tabulka 11 Schéma pipetování dot blotu	55

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Játra - zevní pohled z přední a dolní strany.....	11
Obrázek 2 Schéma jaterního lalůčku	12
Obrázek 3 Schéma tkáňové architektury v jaterní sinusoidě.....	13
Obrázek 4 Rozdělení biochemických drah v játrech do zón	14
Obrázek 5 Buňky rostoucí v Petriho misce pro tkáňové kultury jsou přichycené ke dnu misky a ponořené v tekutém živném médiu	19
Obrázek 6 Hepatocyty kultivované v sendvičové konfiguraci	19
Obrázek 7 Centrifugace v hustotním gradientu s použitím roztoku Percoll.....	24
Obrázek 8 Model procesu tvoření MCS	27
Obrázek 9 Metoda visící kapky	28
Obrázek 10 Příprava sféroidů metodou visací kapky v destičkách Perfecta3D	29
Obrázek 11 Metoda „forced-floating“	29
Obrázek 12 Metody založené na míchání.....	31
Obrázek 13 Zařízení pro mikrofluidní metodu	31
Obrázek 14 Magnetická levitace.....	32
Obrázek 15 Příklady použití biomateriálů při kultivaci sféroidů	34
Obrázek 16 Schéma přípravy roztoků na izolaci hepatocytů	39
Obrázek 17 Princip stanovení viability sféroidů pomocí ATP	41
Obrázek 18 Standardní amplifikační křivka	47
Obrázek 19 Vliv lipogenních substrátů na viabilitu sféroidů (7 dní)	52
Obrázek 20 Vliv lipogenních substrátů na viabilitu sféroidů (14 dní)	54
Obrázek 21 Dot blot analýza albuminu v kultivačním médiu odebraném od jaterních sféroidů inkubovaných po dobu 7 či 14 dnů v přítomnosti lipogenních substrátů	55
Obrázek 22 Expresse genu CYP1A1/2 v jaterních sféroidech v průběhu dlouhodobé inkubace	56
Obrázek 23 Expresse genu CYP3A v jaterních sféroidech v průběhu dlouhodobé inkubace	57
Obrázek 24 Expresse genu NQO1 v jaterních sféroidech v průběhu dlouhodobé inkubace	57

11. POUŽITÁ LITERATURA

- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., & Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282(5739), 615–616. <https://doi.org/10.1038/282615a0>
- Amaral, R. L. F., Miranda, M., Marcato, P. D., & Swiech, K. (2017). Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Frontiers in Physiology*, 8, 605. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00605>
- Ambrosino, G., Basso, S. M. M., Varotto, S., Zardi, E., Picardi, A., & Amico, D. D. (2005). Isolated Hepatocytes Versus Hepatocyte Spheroids : In Vitro Culture of Rat Hepatocytes. *Cell Transplantation*, 14(6), 397–401. <https://doi.org/10.3727/000000005783982954>
- Andria, B., Bracco, A., Cirino, G., & Chamuleau, R. A. F. M. (2010). Liver Cell Culture Devices. *Cell Medicine*, 1(1), 55–70. <https://doi.org/10.3727/215517910X519274>
- Asha, S., & Vidyavathi, M. (2010). Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6), 1699–1722. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8689-6>
- Baker, T. K., Carfagna, M. A., Gao, H., Dow, E. R., Li, Q., Searfoss, G. H., & Ryan, T. P. (2001). Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology*, 14(9), 1218–1231. <https://doi.org/10.1021/tx015518a>
- Bell, C. C., Hendriks, D. F. G., Moro, S. M. L., Ellis, E., Walsh, J., Renblom, A. et al. (2016). Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific Reports*, 6(1), 1–13. <http://dx.doi.org/10.1038/srep25187>
- Breslin, S., & Driscoll, L. O. (2013). Three-dimensional cell culture : the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5–6), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
- Buesch, S., Bungler, M., Schroeder, J., & Stosik, M. (2019). Primary human hepatocyte spheroids generation and performance in different culture systems [online]. Poslední revize 2019 [cit. 2022-09-02]. Dostupné z: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CZ/en/download/content/asset/34835
- Červenková, K., Ulrichová, J., Belejova, M., Veselý, J., Chmela, Z., Rypka, M., et al. (2001). Cell Suspensions , Cell Cultures , And Tissue Slices – Important Metabolic In Vitro Systems. *Biomed. Papers*, 145(2), 57–60. <https://doi.org/10.5507/bp.2001.012>
- Cesarz, Z., & Tamama, K. (2016). Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, 1–11. <https://doi.org/10.155/2016/9176357>
- Chow, A. Y. (2010). Cell cycle control by oncogenes and tumor suppressors: driving the transformation of normal cells into cancerous cells. *Nature Education*, 3(9), 7.

- Cimr, T. (2016). *Hodnocení cytotoxicity v in vitro kulturách buněčných sferoidů*. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita.
- Cui, X., Hartanto, Y., & Zhang, H. (2017). Advances in multicellular spheroids formation. *Journal Of the Royal Society Interface*, *14*(127), 20160877.
- Dudová, S., & Hájek, R. (2008). Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická Onkologie*, *1*, 220–222.
- Ehrmann, J., & Hůlek, P. (2010). *Hepatologie*. 1. vyd. Grada, Praha, 590 s.
- Elaut, G., Henkens, T., Papeleu, P., Snykers, S., Vinken, M., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2006). Molecular Mechanisms Underlying the Dedifferentiation Process of Isolated Hepatocytes and Their Cultures. *Current Drug Metabolism*, *7*(6), 629–660. <https://doi.org/10.2174/138920006778017759>
- Frantz, C., Stewart, K. M., Weaver, V. M., Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, *123*(24), 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- Garc, A. M., P, C. J., Corella-madueño, A. G., Rasc, L., & Astiazaran-garcia, H. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer : Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/8896738>
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., et al. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes , alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity , cell signaling and ADME. *Archives of Toxicology*, *87*(8), 1315–1530. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>
- Gómez-Lechón, M. J., Tolosa, L., Conde, I., & Donato, M. T. (2014). Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, *10*(11), 1553–1568. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.967680>
- Guillouzo, A. (1998). Liver Cell Models in in Vitro Toxicology. *Environmental Health Perspectives*, *106*, 511–532. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106511>
- Gunti, S., Hoke, A. T. K., Vu, K. P., & London, N. R. (2021). Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications. *Cancers*, *13*(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/cancers13040874>
- Gupta, S., & Kumaran, V. (2004). Hepatocytes. In: L. J. Johnson (ed.) *Encyclopedia of Gastroenterology*. Elsevier, San Diego, CA, USA, str. 346–350.
- Horký, D., & Čech, S. (2014). *Mikroskopická anatomie*. 3. vydání. Masarykova Univerzita, Brno, 202 s.

- Horner, R., Gassner, J. G. M. V., Kluge, M., Tang, P., Lippert, S., & Hillebrandt, K. H. (2019). Impact of Percoll purification on isolation of primary human hepatocytes. *Scientific Reports*, 9(1), 2–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43042-8>
- Hubrecht, R. C., & Carter, E. (2019). The 3Rs and Humane Experimental Technique : Implementing Change. *Animals*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/ani9100754>
- Ingelman-Sundberg, M., & Lauschke, V. M. (2022). 3D human liver spheroids for translational pharmacology and toxicology. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 130, 1–11. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13587>
- Ishibashi, H., & Nakamura, M. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Seminars in Immunopathology*, 31(3), 399–409. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0155-6>
- Itatani, J., & Olsen, C. (2019). Measure cancer cell viability using homogeneous, stable luminescence cell viability assay. *Molecular Devices* [online]. Poslední revize 11.2019 [cit. 2022-08-17]. Dostupné z: <https://www.moleculardevices.com/en/assets/app-note/br/measure-cancer-cell-viability-using-homogeneous-stable-luminescence-assay#gref>
- Ivascu, A., & Kubbies, M. (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*, 11(8), 922–932. <https://doi.org/10.1177/1087057106292763>
- Jakubíčková, A. (2009). *Optimalizace kultivačních podmínek hepatocytů v primární kultuře*. Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická. Univerzita Pardubice.
- Kastana, P., Tuz Zahra, F., Ntenekou, D., Katraki-Pavlou, S., Beis, D., Lionakis, M. S., et al. (2019). Matrigel plug assay for in vivo evaluation of angiogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 1952, 219–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9133-4_18
- Kaur, S., Sidiqqi, H., & Bhat, M. H. (2015). Hepatic Progenitor Cells in Action. *The American Journal of Pathology*, 185(9), 2342–2350. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.004>
- Knobeloch, D., Ehnert, S., Schyschka, L., Büchler, P., Schoenberg, M., Kleeff, J., et al. (2011). Human Hepatocytes : Isolation , Culture , and Quality Procedures. *Human Cell Culture Protocols*, 806, 99–120. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_8
- Kono, Y., Yang, S., & Roberts, E. A. (1997). Extended primary culture of human hepatocytes in a collagen gel sandwich system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 33(6), 467–472. <https://doi.org/10.1007/s11626-997-0065-7>
- Kozyra, M., Johansso, I., Nordling, Å., Ullah, S., Lauschke, V. M., & Ingelman-Sundberg, M. (2018). Human hepatic 3D spheroids as a model for steatosis and insulin resistance. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32722-6>

- Krause, P., Saghatolislam, F., Koenig, S., Unthan-Fechner, K., & Probst, I. (2009). Maintaining hepatocyte differentiation in vitro through co-Culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 45(5–6), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s11626-008-9166-1>
- Kučera, O., Lotková, H., Křiváková, P., Roušar, T., Červinková, Z. (2006). Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro. *Československá Fyziologie*, 55, 103–110.
- Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2018). New zoning laws enforced by glucagon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), 4308–4310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804203115>
- Lake, B. G., & Price, R. J. (2013). Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica*, 43(1), 41–53. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.734643>
- Langhans, S. A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Larson, B. (2015). 3D Cell Culture : A Review of Current Techniques [online]. Poslední revize 11.2015 [cit. 2022-08-17]. Dostupné z: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/3d-cell-culture-a-review-of-current-techniques/>
- LeCluyse, E.L., Norona, L.M., Presnell, S. C. (2018). Liver-Structure and Microanatomy. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05123-0>
- Lewis, N. S., Lewis, E. E. L., Mullin, M., Wheadon, H., Dalby, M. J., & Berry, C. C. (2017). Magnetically levitated mesenchymal stem cell spheroids cultured with a collagen gel maintain phenotype and quiescence. *Journal of Tissue Engineering*, 8. <https://doi.org/10.1177/2041731417704428>
- Li, W. C., Ralphs, K. L., & Tosh, D. (2010). Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods in Molecular Biology*, 633(4), 185–196. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-019-5_13
- Li, Y., Gao, M., Wu, D., & Bao, J. (2017). Isolations and Cultures of Primary Hepatocytes. *Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 7(5), 5–8. <https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000322>
- Lin, R.-Z., & Chang, H.-Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, 3(9–10), 1172–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
- Maroni, L., Haibo, B., Ray, D., Zhou, T., Wan, Y., Meng, F., Marzioni, M., Alpini, G. (2015). Functional and Structural Features of Cholangiocytes in Health and Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 1(4), 368–380. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.05.005>

- Martin, H., Sarsat, J. P., Lerche-Langrand, C., Housset, C., Ballardur, P., Toutain, H., & Albaladejo, V. (2002). Morphological and biochemical integrity of human liver slices in long-term culture: Effects of oxygen tension. *Cell Biology and Toxicology*, 18(2), 73–85. <https://doi.org/10.1023/a:1015379815897>
- Mitry, R. R., Hughes, R. D., & Dhawan, A. (2002). Progress in human hepatocytes : isolation , culture & cryopreservation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 13(6), 463–467. <https://doi.org/10.1016/s1084952102001350>
- Mortensen, A., Sorensen, I. K., Wilde, C., Dragoni, S., Mullerová, D., Toussaint, O., et al. (2008). Biological models for phytochemical research: From cell to human organism. *British Journal of Nutrition*, 99(E-S1), 118–126. <https://doi.org/10.1017/s0007114508965806>
- Nakatani, K., Kaneda, K., Seki, S., Nakajima, Y. (2004). Pit cells as liver-associated natural killer cells: Morphology and function. *Medical Electron Microscopy*, 37(1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00795-003-0229-9>
- Ohkura, T., Ohta, K., Nagao, T., Kusumoto, K., Koeda, A., Ueda, T., et al. (2014). Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29(5), 373–378. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-105>
- Page, H., Flood, P., & Reynaud, E. G. (2012). Three-dimensional tissue cultures : current trends and beyond. *Cell and Tissue Research*, 352(1), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1441-5>
- Papeleu, P., Vanhaecke, T., Henkens, T., Elaut, G., Vinken, M., Snykers, S., & Rogiers, V. (2006). Isolation of rat hepatocytes. *Methods in Molecular Biology*, 320(3), 229–237. <https://doi.org/10.1385/1-59259-998-2:229>
- Potter, B. J. (2018). Components of the Hepatic System. *Reference Module in Biomedical Sciences* (pp. 1–5).
- Roth, A., & Singer, T. (2014). The application of 3D cell models to support drug safety assessment: Opportunities & challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 69–70, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.005>
- Ruedinger, F., & Lavrentieva, A. (2014). Hydrogels for 3D mammalian cell culture : a starting guide for laboratory practice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2), 623–636. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6253-y>
- Ryu, N. E., Lee, S. H., & Park, H. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 8(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/cells8121620>
- Sangan, C. B., & Tosh, D. (2010). Hepatic progenitor cells. *Cell and Tissue Research*, 342(2), 131–137. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1055-8>
- Segovia-Zafra, A., Zeo-Sánchez, D. E. D., López-Gómez, C., García-Fuentes, E., Pérez-Valdés, Z., Andrade, R. J., et al. (2021). Preclinical models of idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI): Moving towards prediction. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(12), 3685–3726. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.013>

- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P., Duncan, S. A. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Developmental Cell*, 18(2), 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.01.011>
- Smutný, T. (2017). *Novel approaches for development of in vitro liver cell models*. Disertační práce. Katedra farmakologie a toxikologie. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Univerzita Karlova.
- Soldatow, V. Y., Lecluyse, E. L., Griffith, L. G., & Rusyn, I. (2013). In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology Research*, 2(1), 23–39. <https://doi.org/10.1039/C2TX20051A>
- Spielmann, H., Bochkov, N. R., Costa, L., Guillouzo, A., Heindel, J. J., Parchment, R., Pfaller, W., Peraita, P.P., Zacharewski, T. (1998). 13th Meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals (SGOMSEC): Alternative Testing Methodologies for Organ Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 106(2), 427–439. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106427>
- Tomanová, B. (2015). *PCR v reálném čase a její využití v potravinářství*. Bakalářská práce. Ústav chemie potravin a biotechnologií. Fakulta chemická. Vysoké učení technické v Brně.
- Vellonen, K.-S., Malinen, M., Mannermaa, E., Sub-, A., Toropainen, E., Lou, Y.-R., et al. (2014). A Critical Assessment of In Vitro Tissue Models for ADME and Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, 190, 94–114. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.044>
- Vinken, M., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2012). Primary hepatocyte cultures as in vitro tools for toxicity testing: Quo vadis? *Toxicology in Vitro*, 26(3), 541–544. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.002>
- Vorriink, S. U., Ullah, S., Schmidt, S., Nandania, J., Velagapudi, V., Beck, O., et al. (2017). Endogenous and xenobiotic metabolic stability of primary human hepatocytes in long-term 3D spheroid cultures revealed by a combination of targeted and untargeted metabolomics. *The FASEB Journal*, 31(6), 2696–2708. <https://doi.org/10.1096/fj.201601375R>
- Wedro, B. (2020). Anatomy and Function of the Liver [online]. Poslední revize 04.2022 [cit. 2022-08-30]. Dostupné z: https://www.medicinenet.com/liver_anatomy_and_function/article.htm#what_is_harvoni_what_is_harvoni_used_for
- Wilkening, S., & Bader, A. (2003). Influence of Culture Time on the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes in Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line HepG2. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(4), 207–213. <https://doi.org/10.1002/jbt.10085>
- Wu, X., Roberto, J. B., Knupp, A., Kenerson, H. L., Truong, C. D., Yuen, S. Y., et al. (2018). Precision-cut human liver slice cultures as an immunological platform. *Journal of Immunological Methods*, 455, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.01.012>

- Zeilinger, K., Freyer, N., Damm, G., Seehofer, D., & Knöspel, F. (2016). Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental Biology and Medicine*, *241*(15), 1684–1698. <https://doi.org/10.1177/1535370216657448>
- Zhou, Z., Xu, M. J., & Gao, B. (2016). Hepatocytes: A key cell type for innate immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, *13*(3), 301–315. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.97>