

# 3D CELIČNI MODELI IN NJIHOVA UPORABA PRI TESTIRANJU PROTIRAKAVIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN

## 3D CELL MODELS AND THEIR USE IN TESTING OF ANTICANCER DRUGS

AVTORICE / AUTHORS:

asist. dr. Alja Zottel, mag. biokem.<sup>1</sup>

Vesna Kokondoska Grgič, mag. bioteh.<sup>2</sup>

doc. dr. Maša Sinreih, mag. farm.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Center za funkcijsko genomiko in biočipe,  
Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,  
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

<sup>2</sup> Kemomed Research and Development,  
KEMOMED, d. o. o., svetovanje, trgovina in trženje

<sup>3</sup> Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,  
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: masa.sinreih@gmail.com

### POVZETEK

Večina protirakavih zdravil, ki preidejo iz predkliničnih v klinična preskušanja, nima dovoljenja za promet z zdravilom, kar nakazuje veliko vrzel med rezultati predkliničnih in kliničnih raziskav. Eden izmed razlogov je pomanjkanje ustreznih predkliničnih modelov za testiranje potencialnih zdravilnih učinkovin, saj večino predkliničnih poskusov opravimo na 2D celičnih modelih, ki pa ne odražajo prave narave tumorja. Zato se v zadnjem času vedno bolj v ospredje postavljajo 3D celični modeli. Ti bolje posnemajo mikrookolje, ki je ključna komponenta tumorja. Poznamo več različnih tipov 3D modelov, t. i. 3D modele brez ogrodja in 3D modele z ogrodjem. 3D celični modeli brez ogrodja so pripravljene npr. z uporabo plošče z ultrazvokom pritrditvijo celic, z metodo viseče kapljice, magnetno levitacijo ali z uporabo bioreaktorja. 3D celični modeli z ogrodjem pa so pripravljene tako, da so celice vgrajene v nosilcu, na nosilcu ali pa so modeli pripravljene s 3D biotiskanjem. V prihodnosti bodo tovrstni modeli vedno bolj uporabljeni pri testiranju protirakavih učinkovin.

### KLJUČNE BESEDE:

3D celični modeli, rak, sferoidi, testiranje zdravilnih učinkovin

### ABSTRACT

Most anti-cancer drugs that move from the pre-clinical phase to clinical trials are not approved, indicating a large discrepancy between the results of preclinical and clinical studies. One of the reasons for this is the lack of appropriate preclinical models for drug testing. Most experiments are performed on 2D cell culture models which do not accurately reflect the true nature of a tumor. Therefore, 3D cell models are becoming increasingly prominent. They better replicate tumor microenvironment which is an essential component of the tumor. 3D models can be classified into so-called scaffold-free models and scaffold-based models. Scaffold-free models are generated in a variety of ways, such as using an ultra-low cell attachment plate, a hanging droplet, magnetic levitation or a bioreactor, while 3D scaffold-based models are generated by embedding cells into the scaffold,

seeding on the scaffold or by 3D bioprinting. In the future, such models will be increasingly used for testing anti-cancer drugs.

**KEY WORDS:**

cancer, 3D cell models, drug testing, spheroids

# 1 UVOD

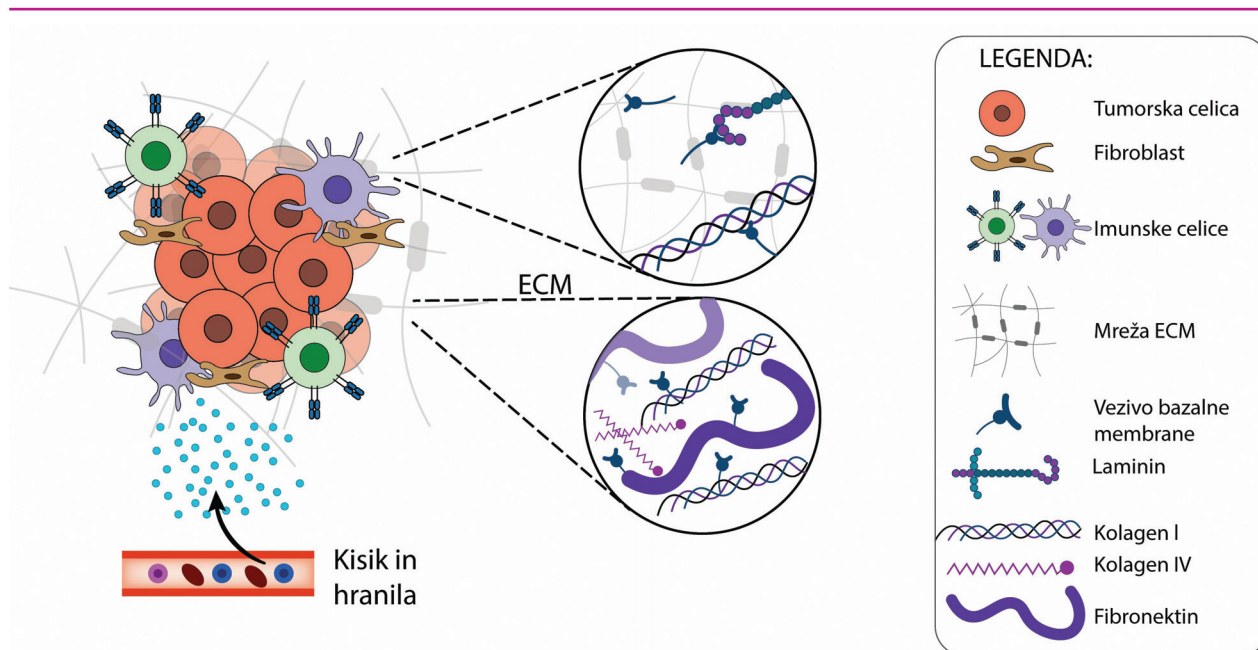
Razvoj novih zdravilnih učinkovin je dolgotrajen in drag proces, ki vodi od razvoja spojin vodnic do kliničnih preskušanj in na koncu klinične rabe. Čeprav je razvoj protirakavih učinkovin že desetletja v ospredju in razmahu, pa je le malo takih, ki uspešno zaključijo klinične raziskave (1, 2). Dve področji, kjer pričakujemo izboljšanje uspešnosti razvoja zdravil, sta iskanje novih bioloških označevalcev in novih tarč za zdravilne učinkovine ter dostopnost novih predkliničnih modelov, ki bodo bolje posnemali biologijo in mikrookoljske dejavnike *in vivo* (3).

Celične linije uporabljamo zaradi njihove nesmrtnosti in dostopnosti pri proučevanju biologije tumorjev, testiranju zdra-

vilnih učinkovin in njihovih učinkov na molekularni ravni. Lahko pa jih vključimo tudi pri iskanju novih potencialnih tarč za zdravljenje in pri visokozmogljivem rešetanju potencialnih spojin z biološko aktivnostjo (3, 4). Raziskave so pokazale, da 3D celične kulture bolje posnemajo okolje *in vivo* kot enostavni 2D modeli, kjer celice rastejo v monoslojih, kar kaže na pomembnost oponašanja arhitekture in mikrookolja *in vivo* (4). Čeprav 2D modele še vedno pogosto uporabljamo pri rešetanju potencialnih zdravilnih učinkovin, pa so znanstveniki že razvili tehnologije, ki omogočajo ponovljive in cenovno dostopne poskuse na 3D modelih.

# 2 PREDNOSTI 3D CELIČNIH MODELOV

Kar devet od desetih kliničnih preskušanj zdravil trenutno ni uspešnih, kar nakazuje izjemno slab prehod zdravilnih učinkovin iz predkliničnih raziskav v klinična preskušanja. Velik preboj pri kliničnih fazah preskušanja se je zgodil leta 2022, ko je ameriška Agencija za hrano in zdravila (FDA) umaknila zahtevo po testiranju novih zdravil na živalih. To



Slika 1: Tumorske celice in njihovo mikrookolje.  
Figure 1: Tumor cells and their microenvironment.



je hkrati izjemno spodbudilo razvoj novih modelov bolezni, ki bi jih uporabljali za testiranje zdravilnih učinkovin (5).

Med najbolj obetavnimi so 3D celični modeli, ki imajo vrsto prednosti pred klasičnimi 2D modeli. Klasični način testiranja zdravilnih učinkovin je uporaba celičnih linij, ki rastejo v monosloju, vendar pa le-te ne ponazarjajo natančno celične rasti. Gojenje tumorskih celičnih linij je sicer precej preprosto, poceni in omogoča visokozmogljivo testiranje, vendar celične kulture nimajo tumorskega mikrookolja, ki je ključna komponenta tumorja in pomembno vpliva na odziv na terapijo (6, 7). Poleg tega celični modeli ne morejo odražati epigenetske, medtumorske in intratumorske kompleksnosti tumorja in ne morejo poustvariti infiltracije celic, nekroze tumorja in mikrovaskularne proliferacije (8, 9). Omejitev celičnih linij je tudi v tem, da lahko serum v celičnem gojišču bistveno spremeni lastnosti celic, dolgotrajnejše gojenje pa selekcionira tiste celice, ki se najhitreje delijo (10, 11). Prednost uporabe 3D modelov je tudi v tem, da lahko z uporabo kokultur poustvarimo različne procese.

Raziskave kažejo, da celice, gojene v nefizioloških 2D pogojih, ne oponašajo ustrezno celic iz kompleksnega mikrookolja tkiva. Celice niso dovolj medsebojno povezane in rastejo v odsotnosti zunajceličnega ogrodja. Molekule zunajceličnega ogrodja vključujejo proteine, kot so kolagen in elastin, glikoproteini, glikozaminoglikani, proteoglikani, rastni dejavniki in drugi (slika 1). Primarno mikrookolje tumorja sestavljajo tudi netumorske celice. Spremembe v teh komponentah uravnavajo celično proliferacijo, diferenciacijo in migracijo, preživetje in adhezijo ter so vključene tudi v odziv celic na zdravilne učinkovine. Poleg tega lahko interakcije med celicami na zunanji strani tumorja in zunajceličnim ogrodjem povzročijo drugačen odziv tumorskih celic na učinkovino kot pri celicah v notranjosti tumorja. Celice v notranjosti tumorja, ki niso v stiku z ogrodjem, namreč propadejo, medtem ko so celice, pritrjene na ogrodje, odpornejše (3, 12).

## 3 METODE PRIPRAVE 3D CELIČNIH MODELOV

Zaradi razvoja novih tehnologij in napredka raziskav na področju biologije celic danes poznamo veliko različnih načinov gojenja 3D celičnih modelov, ki so jih razvili na podlagi poznavanja celično-tkivne zgradbe (13, 14). Pri vzpostavljanju 3D celičnih modelov nastajajo celični agregati, ki jim zaradi

sferične oblike pravimo sferoidi. V grobem poznamo 3D celične modele brez ogrodja in z ogrodjem (slika 2).

### 3.1 3D CELIČNI MODELI BREZ OGRODJA

3D celični modeli brez ogrodja (*3D scaffold free models*) za tvorbo 3D strukture ne potrebujejo nosilca, saj se celice zaradi gravitacije posedejo in zaradi naravne sposobnosti agregacije tvorijo skupke (15). Najstarejša metoda za gojenje 3D celičnih kultur, ki spada med tehnike brez ogrodja, je gojenje celic v **visечи kapljici**. Celice se nabirajo na dnu kapljice, na stiku med tekočino in zrakom, ter se v kapljici povežejo in tvorijo sferoid (16).

Na podobnem principu temelji tudi priprava sferoidov na **ploščah z ultranizko pritrditvijo (ULA)**. Vdolbinice plošče so prevlečene z inertnim substratom (npr. polistirenom), ki blokira pritrditev celic in povzroči, da se celice v suspenziji združijo v vidne sferoide (17). Naprednejši sistemi, ki jih uporabljamo za daljše gojenje sferoidov, so **vrteči bioreaktorji**. Z vrtenjem se zmanjša vpliv gravitacije, s čimer preprečimo pritrdjevanje sferoidov na površino. Posledično plavajo v gojišču in počasi rastejo; celice iz eksponentne faze rasti preidejo v dinamično fazo (18).

Metoda priprave sferoidov **z magnetno levitacijo** uporablja super paramagnetne nanodelce železovega oksida, ki jih adherentne celice med inkubacijo preko noči prevzamejo. Tako označene celice se nasadijo v plošče; magnet postavimo na vrh pokrova plošče in celice se v nekaj urah združijo v sferoide (19).

Vse naštet metode za pripravo 3D modelov brez ogrodja so primerne za gojenje tumorskih celic, zlasti tistih, ki izločajo proteine zunajceličnega ogrodja in so podvržene samozdruževanju v visoko organizirane 3D strukture, podobne tkivu (20).

### 3.2 METODE PRIPRAVE SFEROIDOV Z OGRODJEM

3D celične modele, ki za oporo uporabljajo biomateriale, imenujemo 3D modeli z ogrodjem (angl. 3D scaffold-based models). Glavni namen ogrodja je posnemanje naravnega ECM tkiv (21). ECM celicam zagotavlja mehansko podporo, omogoča medcelično komunikacijo ter aktivira ključne celične procese, kot so adhezija, migracija, proliferacija in diferenciacija (22).

Pri takšnem načinu gojenja lahko nadziramo obliko celičnih sferoidov in prehajanje hranil ter raziskujemo interakcije

med celicami in matriksom. Gojenje sferoidov je dolgotrajnejše, saj rastejo veliko počasneje kot v monosloju. Ker rast celic ni eksponentna, lahko celice večji del svoje energije porabijo za ostale celične procese (23).

Ena od tehnik za pripravo 3D modelov z ogrodjem je »**celice na nosilcu**«, kjer se celice v enocelični suspenziji nasadijo na vrh strjenega nosilca, čemur sledi inkubacija pri 37 °C. Celice se spontano združijo in tvorijo sferoide, medtem ko ostanejo pritrjene na nosilcu (24). Druga različica te tehnike je »**celice, vgrajene v nosilcu**«. Pri tej tehniki celice nasadimo v nosilec, tako da se po zamreževanju biomateriala vgradijo v nosilec (25).

Področje **3D biotiska** je v zadnjih petih letih doseglo znaten tehnološki napredek in je postalo najobetavnejši pristop za razvoj 3D modelov tumorskega tkiva, ki jih je mogoče uporabiti kot modele za proučevanje biologije raka in reševanje novih zdravilnih učinkovin (26). Poleg tega lahko s 3D biotiskom razvijamo biološke nosilce z mikrometrsko prostorsko ločljivostjo z nizkimi strižnimi silami, da lahko

ob tiskanju celice preživijo. Glavna prednost biotiskanja je možnost natančnega posnemanja zelene strukture, fizikalnih lastnosti materialov kot tudi celične sestave izvornega tkiva (27).

Spodnja preglednica (preglednica 1) prikazuje primerjavo med 2D celičnimi modeli, 3D celičnimi modeli brez ogrodja in 3D celičnimi modeli z ogrodjem.

## 4 PRIMERI UPORABE 3D MODELOV ZA TESTIRANJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN

3D modele intenzivno uporabljamo za proučevanje delovanja zdravilnih učinkovin. V tem poglavju bomo na kratko predstavili uporabnost 3D modelov pri šestih različnih rakavih boleznih, raku dojke, raku prostate, raku pljuč, raku jajčnikov, raku trebušne slinavke in glioblastomu. Za vse

*Preglednica 1: Prednosti in slabosti različnih tipov celičnih modelov.*

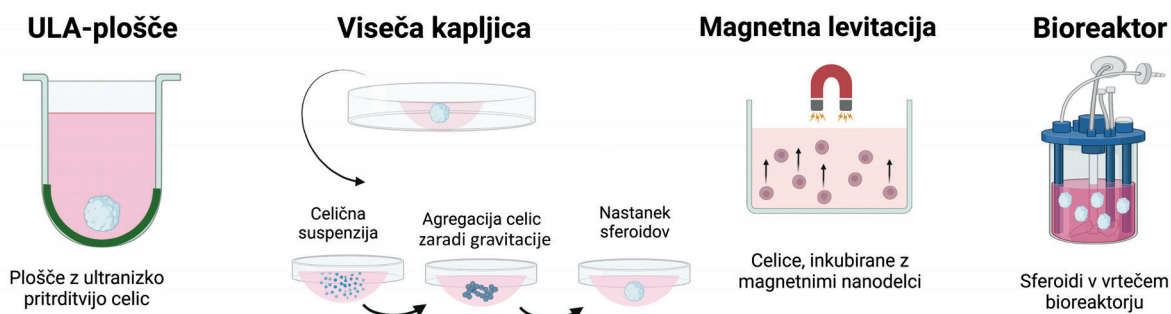
*Table 1: Advantages and disadvantages of different types of cellular models.*

Celični model	Prednosti	Slabosti
2D celični model	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poceni</li> <li>• Uveljavljen</li> <li>• Veliko primerjalne literature</li> <li>• Enostavna analiza celic</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ne predstavlja realnega okolja tkiva</li> <li>• Nepredvidljiv</li> <li>• Selekcija celic pri daljšemu gojenju, nefiziološki celični medij</li> <li>• Genetska nestabilnost</li> </ul>
3D celični model brez ogrodja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hitra tvorba sferoidov</li> <li>• Možnost posnemanja nekrotičnega jedra</li> <li>• Poceni in enostavno za rokovanje</li> <li>• Na eni plošči lahko gojimo veliko število sferoidov</li> <li>• Končne analize lahko delamo na isti plošči</li> <li>• Lahko izvajamo več poskusov naenkrat</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heterogenost sferoidov</li> <li>• Ni interakcij z zunajceličnim ogrodjem</li> <li>• Lahko imamo mešanico pritrjenih celic in sferoidov</li> <li>• Pri magnetni levitaciji morajo biti celice predhodno tretirane z magnetnimi kroglicami. Magnetne kroglice so drage in so lahko pri visoki koncentraciji toksične.</li> </ul>
3D celični model z ogrodjem	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolje posnema mikrookolje <i>in vivo</i></li> <li>• 3D arhitektura ogrodja lahko pospeši interakcije med celicami ali celico in ogrodjem, ki so nujne za funkcijo in naravo celic</li> <li>• Integracija toka</li> <li>• Ustvarjanje bariere tkiva</li> <li>• Bolj realističen način za gojenje in tretiranje tumorskih celic</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Možnost razgradnje ogrodja in toksičnosti</li> <li>• Potreba po specializirani opremljenosti in znanju</li> <li>• Težavno nadzorovanje mikrookolja celičnega sistema</li> <li>• Počasnejša rast in povečan nastanek nekroze zaradi prostorske omejenosti</li> <li>• Hidrogel zahteva posebno ravnanje</li> </ul>

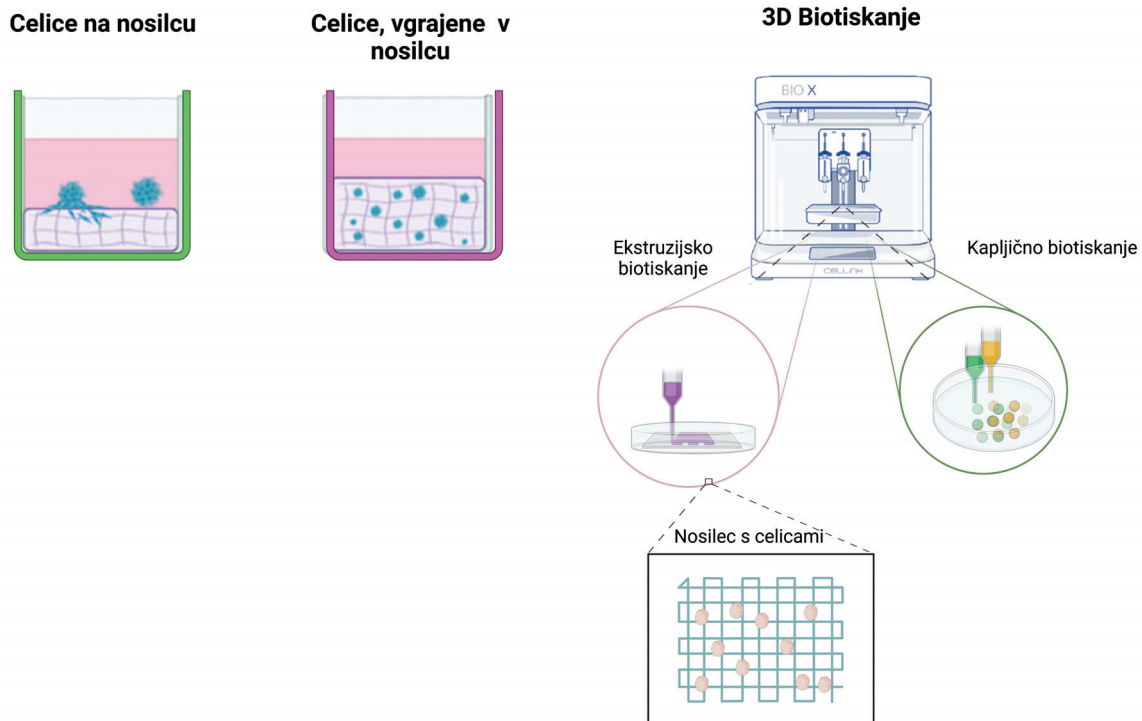


## Vrste 3D celičnih modelov

### A) 3D celični modeli brez ogrodja



### B) 3D celični modeli z ogrodjem



Slika 2: Vrste 3D modelov celičnih kultur; ULA – ultra-low attachment; ustvarjeno z BioRender.com.

Figure 2: Types of 3D cell culture models; ULA – ultra-low attachment, created with BioRender.com.

omenjene rake velja, da imajo visoko smrtnost, zato je odkrivanje novih, učinkovitejših zdravil ključno za boljše obvladovanje bolezni.

## 4.1 RAK DOJKE

Rak dojke je najpogosteje diagnosticiran rak in najpogostejši vzrok smrti zaradi raka pri ženskah. Rak dojke razdelimo na več podtipov, odvisno od prisotnosti hormonskih receptorjev, povišanega nivoja receptorja za epidermalni rastni dejavnik 2 (HER2) in dodatne kopije gena HER2. Zdravljenje in prognoza bolezni sta odvisna od podtipa (28). Rak dojke je zaradi visoke pogostosti in umrljivosti velik družbeni in zdravstveni problem, zato je razvoj na tem področju izjemnega pomena.

Domingues in sod. so nadgradili osnovni model sferoidov, tako da so ustvarili heterogeni sferoid, sestavljen iz celične linije raka dojke MCF-7, monocitov in fibroblastov. Sferoide so nato tretirali s paklitakselom, gefitinibom in z nanodelci z gefitinibom, rezultate pa so primerjali z rezultati na ustrezni 2D kulturi. Ugotovili so, da je trend preživetja celic v prisotnosti določenega kemoterapevtika v 3D modelih primerljiv z 2D, le da so učinki na 3D kulture šibkejši kot pri 2D (29).

## 4.2 RAK PROSTATE

Rak prostate je najpogostejši rak pri moških in drugi najpogostejši vzrok smrti zaradi raka pri moških. Zdravljenje v začetni stopnji obsega kirurško odstranitev prostate, radioterapijo, brahiterapijo, krioterapijo in androgeno odtegnitveno terapijo. Pogosto pa rak prostate napreduje v od androgenov neodvisno stanje, ki ima slabo prognozo in visok metastatski potencial (30). Razvoj 3D celičnih modelov je pri tem raku ključen za boljše testiranje novih potencialnih terapij.

Boccellino in sod. so razvili sferoide celičnih linij raka prostate in jih gojili v ogrodju Matrigela. Sferoide so nato tretirali s tremi kemoterapevtiki, cisplatinom, paklitakselom in docetakselom ter s kurkuminom. Preživetje celic so nato določili z reagentom MTT. Ugotovili so, da ima kurkumin podoben učinek na preživetje sferoidov kot kemoterapevtiki (30). Jouberton in sod. so prav tako razvili sferoide iz celične linije raka prostate. Gojili so jih v ogrodju iz metilceluloze. 2D kulturo in sferoide različnih starosti so nato tretirali z docetakselom. Ugotovili so, da je  $IC_{50}$  za docetaksel najvišji pri najstarejših sferoidih in najnižji pri 2D kulturi (31).

## 4.3 PLJUČNI RAK

Rak pljuč je eden izmed najpogostejših vzrokov smrti pri moških in ženskah, saj povzroča več kot 25 % smrti zaradi raka. Najpogostejši rak pljuč je nemajhnocelični karcinom pljuč, ki ima nizko stopnjo preživetja, približno 26 % v petih letih (32). Zdravljenje je odvisno od histologije in genetskega profila tumorja oz. mutacij v genih *EGFR*, *ROS1*, *ALK*, *NTRK1*, *BRAFV600E*, *RET* in *KRAS* (33). Podobno kot pri ostalih vrstah tumorjev je tudi pri pljučnem raku prisotno pomanjkanje klinično relevantnih modelov.

Qi in sod. so razvili modele sferoidov iz celične linije nemajhnoceličnega raka pljuč. Pripravili so sferoide brez ogrodja in z ogrodjem kolagena. Sferoide in 2D celice so nato tretirali s petimi kemoterapevtiki, pemetreksedom, gemcitabinom, paklitakselom, cisplatinom in etopozidom. Pri vseh petih kemoterapevtikih so opazili, da so vrednosti  $IC_{50}$  najnižje pri 2D modelu, srednje pri sferoidih brez ogrodja ter najvišje pri sferoidih z ogrodjem (34). Podobno so Luan in sod. razvili sferoide iz treh celičnih linij nemajhnoceličnega raka pljuč. Sferoide so gojili na plošči z 12 vdolbinami, kjer je vsaka vdolbina vsebovala 1000 agaroznih mikroluknjic. Sferoide so nato tretirali z dvema inhibitorjema receptorja za epidermalni rastni dejavnik, ki sta odobrena s strani FDA za zdravljenje pljučnega raka. Preživetje sferoidov so določili kot razmerje med živimi sferoidi (sferoidi brez mrtvih celic, določeno s fluorescenco) in vsemi sferoidi. Rezultate so primerjali z rezultati na 2D kulturi ter ugotovili, da je  $IC_{50}$  pri sferoidih višji kot pri 2D kulturi (32).

## 4.4 RAK JAJČNIKOV

Rak jajčnikov je najbolj smrtonosen od vseh ginekoloških malignih bolezni ter peti vodilni vzrok smrti zaradi raka pri ženskah po vsem svetu (35). Je bolezen s kompleksnim tumorskim mikrookoljem, ki ga je v laboratorijskih raziskavah težko posnemati. Poleg tega je predklinično reševanje novih spojin z uporabo tradicionalnih 2D kultur in živalskih modelov povezano z nizko korelacijo s podatki, pridobljenimi v kliničnih preskušanjih.

Loessner in sod. (36) so opisali 3D sferoidni model z uporabo hidrogelov in pokazali, da celice raka jajčnikov proizvajajo svoje lastno zunajcelično ogrodje, ki omogoča preživetje in proliferacijo večceličnih sferoidov in interakcije med celicami. Njihov hidrogelni 3D sferoidni model je pokazal večjo odpornost na zdravilne učinkovine proti raku kot 2D modeli. Leta 2020 objavljena raziskava pa kaže, da je metoda prisilnega lebdenja celic v ploščah z ultrazviko



pritrditvijo primernejša in enostavnejša za ustvarjanje sferoidov raka jajčnikov za reševanje zdravilnih učinkovin in teste citotoksičnosti kot metoda viseče kapljice (37). Prva velika panelna raziskava, objavljena v *Nature* leta 2013, je vzpostavila in opisala 3D modele *in vitro* iz 31 celičnih linij epitelijskega raka jajčnikov. Njihove biološke in molekularne značilnosti so primerjali z značilnostmi 2D kultur in primarnih tumorjev ter z merjenjem celične viabilnosti testirali njihovo učinkovitost kot modelov za ocenjevanje odzivnosti celic na cisplatin in paklitaksel (38). Ugotovili so, da se odziv v sferoidih razlikuje od odziva 2D kulture.

#### 4.5 RAK TREBUŠNE SLINAVKE

Rak trebušne slinavke je eden izmed najsmrtonosnejših rakov z izjemno nizkim preživetjem, le 2 do 9 % v petih letih (39). Najpogostejše zdravljenje obsega kirurško odstranitev tumorja, kemoterapijo in radioterapijo (40). Driehuis in sod. so razvili 3D celične modele iz tkiva tumorja trebušne slinavke, izoliranega iz bolnikov, in jih gojili v prisotnosti ekstrakta bazalne membrane. Vsakega od teh so tretirali s 76 različnimi zdravilnimi učinkovinami. Z vrednotenjem celične viabilnosti so ugotovili, da se 3D modeli iz različnih bolnikov nanje različno odzivajo. Za štiri bolnike so odziv modela primerjali z odzivom bolnika in ugotovili, da se rezultati ujemajo z rezultati bolnikov na zdravilno učinkovino (41). Podobno so tudi Henning in sod. razvili 3D celične modele iz tkiva tumorja trebušne slinavke in z vrednotenjem celične viabilnosti analizirali vpliv kemoterapije. Pokazali so, da se različni modeli različno odzivajo na kemoterapijo in bi lahko v prihodnosti služili za napovedovanje najučinkovitejšega zdravljenja s čim manj neželenimi učinki (42).

#### 4.6 GLIOBLASTOM

Glioblastom je najpogostejši primarni možganski tumor in spada v skupino gliomov, tumorjev glia celic. Je tudi eden izmed najbolj smrtonosnih rakov, saj je petletno preživetje bolnikov le 5,6-odstotno kljub prejetju standardne terapije (43).

Ratliff in sod. so razvili sferoide iz tkiva ponavljajočega se tumorja glioblastoma in jih testirali s protirakovimi zdravilnimi učinkovinami, odobrenimi s strani FDA. Ugotovili so, da se modeli različnih tumorjev različno odzivajo na učinkovine in da nekateri tumorji ostajajo odporni na vse učinkovine. Prednost te metode, še posebej v kontekstu klinične uporabe, je bila, da je od časa operacije bolnika do pridobitve rezultata o učinkovitosti učinkovin na modelih minilo 15 dni, kar je ustrezno za personalizirano terapijo (44).

## 5 SKLEP

Raziskave 3D modelov kažejo, da bi lahko v prihodnosti služili kot boljša alternativa 2D celičnim modelom. Postajajo pa tudi vse bolj primerljivi in v nekaterih kontekstih celo boljši modeli kot živalski, predvsem v zahtevnosti in cenovni ugodnosti poskusov. Vseeno pa so trenutno za nekatere primere živalski modeli nepogrešljivi, še posebej na področju farmakokinetike. 3D modele bi lahko v prihodnosti uporabili tudi za razvoj personaliziranega zdravljenja, saj je rak izjemno heterogena skupina boleznih, večina rakov ima tudi več podtipov.

Vendar pa bo za učinkovito klinično preskušanje in klinično uporabo zdravil potrebno preseči določene omejitve. Med najpomembnejšimi je slaba ponovljivost poskusov med posameznimi laboratoriji. Poleg tega je gojenje 3D modelov precej dražje v primerjavi z gojenjem 2D celičnih modelov. Kljub večji podobnosti sferoidov originalnim tumorjem je še vedno velik izziv ohranjanje ali poustvarjanje komponent imunskega sistema in ožilja. Poleg tega je večina raziskav opravljenih izključno na 3D modelih brez primerjave z bolniki, zato še ni popolnoma jasno, v kolikšni meri so rezultati primerljivi z odzivom bolnikov. Rezultati raziskav tudi odpirajo vprašanje, katere metode za gojenje sferoidov so najboljše, saj ne dajejo primerljivih rezultatov.

## 6 LITERATURA

- Hait WN. *Anticancer drug development: the grand challenges*. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(4):253-4.
- Breslin S, O'Driscoll L. *Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery*. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):240-9.
- Langhans SA. *Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning*. *Front Pharmacol*. 2018;9:6.
- Lv D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu X. *Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review)*. *Oncol Lett*. 2017;14(6):6999-7010.
- Wadman M. *FDA no longer has to require animal testing for new drugs*. *Science*. 2023;379(6628):127-8.
- Goodspeed A, Heiser LM, Gray JW, Costello JC. *Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics*. *Mol Cancer Res*. 2016;14(1):3-13.
- Neal JT, Li X, Zhu J, Giangarra V, Grzeskowiak CL, Ju J, et al. *Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment*. *Cell*. 2018;175(7):1972-88 e16.

8. Pernik MN, Bird CE, Traylor JI, Shi DD, Richardson TE, McBrayer SK, et al. Patient-Derived Cancer Organoids for Precision Oncology Treatment. *J Pers Med.* 2021;11(5).
9. Zhang C, Jin M, Zhao J, Chen J, Jin W. Organoid models of glioblastoma: advances, applications and challenges. *Am J Cancer Res.* 2020;10(8):2242-57.
10. Ruiz-Garcia H, Alvarado-Estrada K, Schiapparelli P, Quinones-Hinojosa A, Trifiletti DM. Engineering Three-Dimensional Tumor Models to Study Glioma Cancer Stem Cells and Tumor Microenvironment. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:558381.
11. Gomez-Oliva R, Dominguez-Garcia S, Carrascal L, Abalos-Martinez J, Pardillo-Diaz R, Verastegui C, et al. Evolution of Experimental Models in the Study of Glioblastoma: Toward Finding Efficient Treatments. *Front Oncol.* 2020;10:614295.
12. Muranen T, Selfors LM, Worster DT, Iwanicki MP, Song L, Morales FC, et al. Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive resistance in matrix-attached cancer cells. *Cancer Cell.* 2012;21(2):227-39.
13. Singh A, Tayalia P. Three-dimensional cryogel matrix for spheroid formation and anti-cancer drug screening. *J Biomed Mater Res A.* 2020;108(2):365-76.
14. Antoni D, Burckel H, Jossset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):5517-27.
15. Barbosa MAG, Xavier CPR, Pereira RF, Petrikaitė V, Vasconcelos MH. 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *Cancers (Basel).* 2021;14(1).
16. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.* 2003;83(2):173-80.
17. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol.* 2012;10:29.
18. Wrzesinski K, Rogowska-Wrzesinska A, Kanlaya R, Borkowski K, Schwammle V, Dai J, et al. The cultural divide: exponential growth in classical 2D and metabolic equilibrium in 3D environments. *PLoS One.* 2014;9(9):e106973.
19. Tseng H, Gage JA, Shen T, Haisler WL, Neeley SK, Shiao S, et al. A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. *Sci Rep.* 2015;5:13987.
20. Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, Sinha B, Kiessling TR, Fetter L, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(37):14843-8.
21. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2009;103(4):655-63.
22. Atat OE, Farzaneh Z, Pourhamzeh M, Taki F, Abi-Habib R, Vosough M, et al. 3D modeling in cancer studies. *Hum Cell.* 2022;35(1):23-36.
23. Yee C, Dickson KA, Muntasir MN, Ma Y, Marsh DJ. Three-Dimensional Modelling of Ovarian Cancer: From Cell Lines to Organoids for Discovery and Personalized Medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:836984.
24. Ingeson-Carlsson C, Martinez-Monleon A, Nilsson M. Differential effects of MAPK pathway inhibitors on migration and invasiveness of BRAF(V600E) mutant thyroid cancer cells in 2D and 3D culture. *Exp Cell Res.* 2015;338(2):127-35.
25. Guimaraes CF, Ahmed R, Marques AP, Reis RL, Demirci U. Engineering Hydrogel-Based Biomedical Photonics: Design, Fabrication, and Applications. *Adv Mater.* 2021;33(23):e2006582.
26. Datta P, Dey M, Ataie Z, Unutmaz D, Ozbolat IT. 3D bioprinting for reconstituting the cancer microenvironment. *NPJ Precis Oncol.* 2020;4:18.
27. Zhang B, Gao L, Ma L, Luo Y, Yang H, Cui Z. 3D Bioprinting: A Novel Avenue for Manufacturing Tissues and Organs. *Engineering.* 2019;5(4):777-94.
28. Okuyama NCM, Ribeiro DL, da Rocha CQ, Pereira ER, Colus IMS, Serpeloni JM. Three-dimensional cell cultures as preclinical models to assess the biological activity of phytochemicals in breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2023;460:116376.
29. Domingues M, Pereira CL, Sarmento B, Castro F. Mimicking 3D breast tumor-stromal interactions to screen novel cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci.* 2023:106560.
30. Boccellino M, Ambrosio P, Ballini A, De Vito D, Scacco S, Cantore S, et al. The Role of Curcumin in Prostate Cancer Cells and Derived Spheroids. *Cancers (Basel).* 2022;14(14).
31. Jouberton E, Voissiere A, Penault-Llorca F, Cachin F, Miot-Noirault E. Multicellular tumor spheroids of LNCaP-Luc prostate cancer cells as in vitro screening models for cytotoxic drugs. *Am J Cancer Res.* 2022;12(3):1116-28.
32. Luan Q, Becker JH, Macaraniag C, Massad MG, Zhou J, Shimamura T, et al. Non-small cell lung carcinoma spheroid models in agarose microwells for drug response studies. *Lab Chip.* 2022;22(12):2364-75.
33. Rossi R, De Angelis ML, Xhelli E, Sette G, Eramo A, De Maria R, et al. Lung Cancer Organoids: The Rough Path to Personalized Medicine. *Cancers (Basel).* 2022;14(15).
34. Qi X, Prokhorova AV, Mezentsev AV, Shen N, Trofimenko AV, Filkov GI, et al. Comparison of EMT-Related and Multi-Drug Resistant Gene Expression, Extracellular Matrix Production, and Drug Sensitivity in NSCLC Spheroids Generated by Scaffold-Free and Scaffold-Based Methods. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21).
35. Aletti GD, Gallenberg MM, Cliby WA, Jatoi A, Hartmann LC. Current management strategies for ovarian cancer. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(6):751-70.
36. Loessner D, Stok KS, Lutolf MP, Huttmacher DW, Clements JA, Rizzi SC. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials.* 2010;31(32):8494-506.
37. Tofani LB, Abriata JP, Luiz MT, Marchetti JM, Swiech K. Establishment and characterization of an in vitro 3D ovarian cancer model for drug screening assays. *Biotechnol Prog.* 2020;36(6):e3034.
38. Lee JM, Mhaweche-Fauceglia P, Lee N, Parsanian LC, Lin YG, Gayther SA, et al. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Lab Invest.* 2013;93(5):528-42.
39. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol.* 2018;24(43):4846-61.
40. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, et al. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16022.
41. Driehuis E, van Hoeck A, Moore K, Kolders S, Francies HE, Gulersonmez MC, et al. Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(52):26580-90.
42. Hennig A, Baenke F, Klimova A, Drukewitz S, Jahnke B, Bruckmann S, et al. Detecting drug resistance in pancreatic





- cancer organoids guides optimized chemotherapy treatment. *J Pathol.* 2022;257(5):607-19.
43. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol.* 2018;20(suppl\_4):iv1-iv86.
44. Ratliff M, Kim H, Qi H, Kim M, Ku B, Azorin DD, et al. Patient-Derived Tumor Organoids for Guidance of Personalized Drug Therapies in Recurrent Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12).