

3D BIOTISK KOT INOVATIVNA METODA ZA MODELIRANJE RAKA JAJČNIKOV

3D BIOPRINTING AS AN INNOVATIVE METHOD FOR MODELING OVARIAN CANCER

AVTORJI / AUTHOS:

Vesna Kokondoska Grgič, mag. bioteh.^{1,2}

doc. dr. Maša Sinreih, mag. farm.¹

prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.³

viš. znan. sod., asist. dr. Ivana Jovčevska, inž. kem.^{1,4}

¹ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Kemomed Research and Development,
Brnčičeva ulica 31, 1231 Ljubljana

³ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

⁴ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta,
Center za funkcijsko genomiko in biočipe,
Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko,
Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: ivana.jovcevska@mf.uni-lj.si

POVZETEK

Rak jajčnikov je heterogena bolezen s kompleksnim tumorskim mikrookoljem. Zdravljenje poteka s kirurškim posegom, ki mu sledi kemoterapija. Velik izziv zdravljenja predstavlja pridobljena kemorezistenca. Da bi natančno proučili mehanizme napredovanja raka jajčnikov, so do sedaj najpogosteje uporabljali 2D celične kulture in živalske modele. Novejše raziskave kažejo, da so 3D kulture ustreznejši model za raziskovanje biologije raka jajčnikov in testiranje zdravilnih učinkovin. Sodobne tehnologije, kot je 3D biotisk, omogočajo konstrukcijo kompleksnih struktur in ustvarjanje 3D celičnih modelov, ki so boljši približek naravni arhitekturi tumorja. 3D mono- ali kokulture so primernejše za odkrivanje novih proteinskih tarč in visokozmogljivo presejanje zdravilnih učinkovin. Razvoj kompleksnih 3D kultur bo prispeval k boljšemu razumevanju raka jajčnikov in identifikaciji učinkovitejših zdravilnih učinkovin.

KLJUČNE BESEDE:

3D biotisk, 3D modeli celičnih kultur, invazija, migracija, rak jajčnikov, sferoidi

ABSTRACT

Ovarian cancer is a heterogeneous disease with a complex tumour microenvironment. Current treatment consists of surgery followed by chemotherapy. Acquired chemoresistance is a major challenge in the treatment. To study the mechanisms of ovarian cancer progression in detail, mostly 2D cell cultures and animal models have been used so far. Recent studies show that 3D cultures are a more appropriate model for studying ovarian cancer biology and testing therapeutics. Modern technologies, such as 3D bioprinting, enable the construction of complex structures and the creation of 3D cellular models that better represent the natural architecture of the tumour. 3D mono- or co-cultures are better suited for the discovery of new protein targets and high-throughput screening of medicinal agents. The development of complex 3D cultures will contribute to a better understanding of ovarian cancer and the identification of more effective therapeutics.

KEY WORDS:

3D bioprinting, 3D cell culture models, invasion, migration, ovarian cancer, spheroids

1 UVOD

Rak jajčnikov je najsmrtonosnejši ginekološki rak ter peti vodilni vzrok smrti zaradi raka pri ženskah po vsem svetu. Pojavlja se primarno pri ženskah po menopavzi in je zaradi nespecifičnih simptomov diagnosticiran v napredni fazi bolezni. Čeprav je zdravljenje raka jajčnikov v zadnjem desetletju bistveno napredovalo, je petletna stopnja preživetja bolnic z rakom jajčnika še vedno pod 30 % (1–3). Glavni izziv zdravljenja raka jajčnikov predstavlja pridobljena kemorezistenca (4).

Da bi natančno proučili mehanizme napredovanja raka jajčnikov, so do sedaj najpogosteje uporabljali 2D celične kulture in živalske modele. Rak jajčnikov je zelo heterogena bolezen s kompleksnim tumorskim mikrookoljem, ki ga je težko oponašati z 2D modeli celičnih kultur in tudi z živalskimi modeli. Kljub vsestranski uporabnosti je omejitev 2D celičnih kultur njihova poenostavljenost, ki ne odraža dejanskega stanja *in vivo* (5, 6). Mišji modeli raka jajčnikov so se nedvomno izkazali kot koristni za pridobitev informacij

o biologiji raka in tudi za predklinično preskušanje zdravilnih učinkovin (7). Večina teh modelov temelji na ksenotransplantaciji človeških celic raka jajčnikov v miši z imunsko pomanjkljivostjo. Slabosti teh modelov sta nepopolno posnemanje interakcij med celicami in gostiteljem ter nezmožnost modeliranja zgodnje faze tumorskega razvoja (7).

Pomanjkanje ustreznega modela *in vitro*, ki bi lahko reproduciral naravno tumorsko okolje, prispeva k manjši uspešnosti predkliničnih raziskav novih zdravilnih učinkovin (8). Vpeljava 3D celičnih modelov *in vitro* za testiranje novih zdravilnih učinkovin za zdravljenje raka jajčnikov predstavlja nov pristop, ki bo spremenil potek predkliničnih raziskav ter posledično zdravljenje raka jajčnikov (9). 3D celične kulture gojimo v neadherentnih ali nizkoaderentnih pogojih, kot so plošče z ultranizko pritrditvijo (*ultra-low attachment (ULA) plates*). Pri teh pogojih površine plošč niso obdelane s proteini zunajceličnega matriksa (npr. kolagen, fibronektin, laminin), ki olajšajo pritrnitev celic in tako omogočijo tvorbo uniformnih sferoidov z nizko variabilnostjo in visoko ponovljivostjo izvedenih poskusov.

Razvili so številne metodologije in tehnike za učinkovito ustvarjanje 3D celičnih modelov (8, 10–12). Najpogosteje uporabljeni 3D modeli raka jajčnikov so večcelični tumorski

Preglednica 1: Obstoječi sferični modeli raka jajčnikov (13).

Table 1: Current spherical ovarian cancer models (13).

3D model	Nastanek	Prednosti	Slabosti	Uporaba pri raziskavah
Večcelični tumorski sferoidi	nastajajo v neadherentnih pogojih iz enoceličnih suspenzijskih kultur	<ul style="list-style-type: none"> - kompaktni - reproducirajo dinamike tumorja <i>in vivo</i> (morfologija, celične interakcije, aktivacija poti ERK1/2 MAPK in PI3K ± AKT) 	<ul style="list-style-type: none"> - časovno potratni postopki za optimizacijo in karakterizacijo modela - pomanjkanje literaturnih virov 	<ul style="list-style-type: none"> - odpornost na ionizirajoče sevanje - občutljivost in odpornost na kemoterapijo - visokozmogljivo testiranje zdravil - migracija - invazija - hipoksija - metabolizem raka - angiogeneza
Sferoidi rakavih matičnih celic, t. i. tumorsferoidi	nastajajo v nizkoaderentnih pogojih v gojišču za matične celice	<ul style="list-style-type: none"> - hierarhijska organizacija - prisotnost redkih matičnih rakavih celic - sposobnost tvorbe tumorjev v modelih <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - ne posnemajo rakavega tkiva - ne replicirajo 3D strukture in mikrookolja tumorja <i>in vivo</i> - pomanjkanje označevalcev celične površine - odsotnost morfološkega fenotipa zaradi nestabilnosti fenotipa matičnih celic 	<ul style="list-style-type: none"> - odziv na kemoterapijo - personalizirano testiranje protirakavih učinkovin - sposobnost večlinijske diferenciacije - analiza rakavih matičnih celic



Sferoidi tumorjev, pridobljenih iz tkiv	nastajajo iz rakavih celic po delni disociaciji rakavega tkiva	<ul style="list-style-type: none"> - sposobnost rekapitulacije avaskularne tumorske mikroregije - posnamejo histološke karakteristike raka, profil genskega izražanja, mutacije, tumorigen in metastatski potencial 		<ul style="list-style-type: none"> - napovedovanje odziva bolnika na kemoterapijo - metastatski potencial
Organotipski večcelični sferoidi	nastajajo z gojenjem rakavega tkiva <i>ex vivo</i> brez disociacije	<ul style="list-style-type: none"> - najbolj podobni tumorjem <i>in vivo</i> - morfološko podobni izvornim tumorjem - povzamejo heterogenost raka - ohranjajo prisotnost makrofagov in žil s progastimi vlakni kolagena, povezanimi s fibroblasti - stabilni genetski profil 	- heterogeni modeli	<ul style="list-style-type: none"> - učinek protirakavih učinkovin - migracija - invazija

sferoidni modeli, sferoidi rakavih matičnih celic, t. i. tumorsferoidi, sferoidi tumorjev, pridobljenih iz tkiv, in organotipski večcelični sferoidi (preglednica 1) (13). Metode 3D biotiska pri raku jajčnikov so zaenkrat še manj razvite.

Čeprav še vedno ni popolnega 3D modela *in vitro*, ki bi nadomestil trenutne predklinične modele *in vivo*, razvoj novih metod in tehnologije premika področje k natančnejšemu pristopu proučevanja tumorjev in odzivu na zdravilne učinkovine (14, 15).

2 RAK JAJČNIKOV IN NJEGOVO ZDRAVLJENJE

Rak jajčnikov predstavlja heterogeno skupino tumorjev (5). Glede na histologijo in stopnjo diferenciacije ga tradicionalno delimo na tumorje tipov I in II. Tip I so večinoma tumorji nižjih gradusov z dobro diferenciacijo, ki predstavljajo 25 % primerov in vključujejo serozne, endometrioidne,

svetlocelične in mucinozne tumorje. Tumorji tipa I izvirajo iz predneoplastičnih lezij ali endometrioze, običajno napredujejo počasi in imajo boljšo prognozo. Tumorji tipa II so serozni karcinomi visokega gradusa (HGSOC), ki nastanejo *de novo* iz površinskega epitelijskega jajčnikov ali jajcevodov in predstavljajo več kot 70 % vseh primerov raka jajčnikov (16, 17).

Zdravljenje raka jajčnikov je običajno operativno, sledi kemoterapija, kot je prikazano na sliki 1. Najpogosteje uporabljena zdravila za kemoterapijo so derivati platine in takساني. Ta zdravila inducirajo apoptozo v tumorskih celicah (18). Trenutno ciljno zdravljenje uporabljamo samo za izboljšanje učinkovitosti standardnega zdravljenja. Ena izmed novih možnosti zdravljenja vključuje zaviralce encima poli-ADP-riboza polimeraze (zaviralci PARP), kot je zdravilo olaparib. Proteini PARP so vključeni v regeneracijo celic po poškodbah, ki jih povzroči kemoterapija. Zaviralci PARP ustavijo regeneracijo celic in posledično rast tumorja (16). Druga možnost zdravljenja vključuje bevacuzimab, monoklonsko protitelo, ki zavira vaskularni endotelijski rastni dejavnik A (VEGF-A) in blokira angiogenezo. Raziskave kažejo

tudi, da so zaviralci tirozin kinaz RTK (npr. zdravilna učinkovina ponatinib) učinkoviti pri zdravljenju različnih malignih rakov z zaviranjem proliferacije tumorskih celic (19). Zaviralci imunskih kontrolnih točk, kot sta pembrolizumab in nivolumab, ki sta najpogosteje uporabljana v onkologiji za zdravljenje HGSOE sta v zgodnjih kliničnih fazah. Gre za monoklonska protitelesa, ki sprožijo aktivacijo imunskih celic T za napad na rakave celice. Terapija z modificiranimi celicami T (CAR-T) je učinkovita pri zdravljenju hematoloških malignih bolezni, vendar je njen uspeh pri zdravljenju solidnih tumorjev omejen zaradi slabe učinkovitosti in visokih stroškov (20). Terapija s transgenimi T-limfocitnimi receptorji (TCR-T) predstavlja alternativni način zdravljenja za tovrstne tumorje (20). Medtem ko so pri terapiji CAR-T tarčni antigeni le proteini celične površine, TCR-T lahko prepozna tudi fragmente znotrajceličnih proteinov, če so prikazani na molekulah poveljavnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC). To je tako prednost kot slabost TCR-T, saj je odvisna od predstavitve molekul na MHC. Pri imunološko neodzivnih tumorjih bo imela somatska izguba HLA-1 negativen

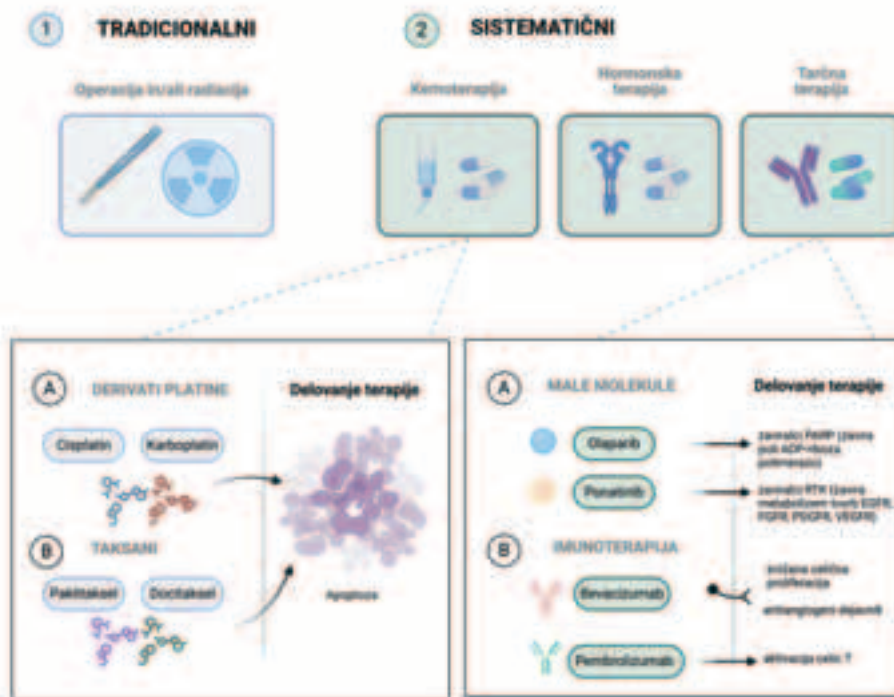
vpliv na TCR-T. CAR-T je kljub temu vstopila v predklinična preskušanja (21). Za zdravljenje raka jajčnikov sta CAR-T in TCR-T trenutno v začetnih fazah kliničnega preskušanja (20, 22).

Konvencionalno zdravljenje ni specifično, cilja na splošne podobnosti fiziologije rakavih celic in ne na posamezne dejavnike, ki se pojavijo pri pacientkah. To omejuje učinkovitost zdravljenja in vodi do neželenih kliničnih izidov ter ponovitve raka, ki pa je odporen na zdravljenje. Zato so potrebni novi, selektivni načini zdravljenja.

3 MODELNE CELIČNE LINIJE RAKA JAJČNIKOV

Gojenje 2D tumorskih celičnih linij raka jajčnikov je preprosto, poceni in omogoča učinkovito testiranje različnih zdravilnih učinkovin. Vendar ti modeli ne reproducirajo tumor-

NAČINI ZDRAVLJENJA RAKA JAJČNIKOV



Slika 1: Načini zdravljenja raka jajčnikov. Izdelano s pomočjo BioRender.com.

Figure 1: Ovarian cancer treatment methods. Content created by using BioRender.com.

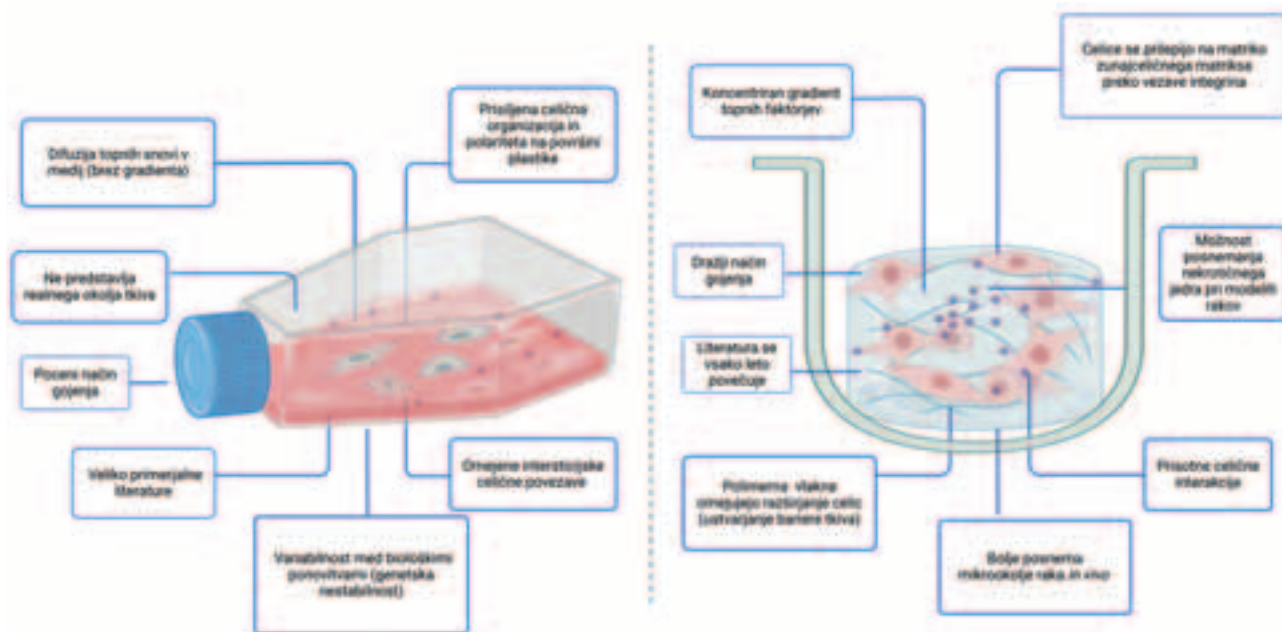
skega mikrookolja zaradi pomanjkanja medsebojne povezanosti in prisotnosti zunajceličnega ogrodja, vključno z molekulami, kot so kolagen, elastin, glikoproteini, glikozaminoglikani, proteoglikani in rastni dejavniki, ki so ključni za vpliv terapije. Celični modeli ne zajemajo epigenetske, inter- in intratumorske kompleksnosti ter ne simulirajo infiltracije celic, nekroze tumorja in mikrovaskularne proliferacije (23, 24). Poleg tega so številne signalne poti, ki so vključene v kemorezistenco, spremenjeno aktivirane v enoslojnih kulturah, kar daje veliko lažno pozitivnih rezultatov pri rešetanjih z uporabo 2D celičnih modelov (25, 26).

3D celični modeli so postali ključni del celične biologije, saj verodostojno reproducirajo značilnosti in mikrookolje rakavih celic. Primerjava modelov 2D in 3D celičnih kultur je prikazana na sliki 2 ter podrobno opisna v preglednem članku Zottel in sod. (25). Uporaba 3D modelov omogoča natančnejšo reprodukcijo fizioloških pogojev, vključno s kompleksnimi interakcijami med celicami in zunajceličnim ogrodjem. Zato so 3D celični modeli pogosto občutljivejši na terapije z zdravilnimi učinkovinami. Raziskave kažejo, da so celice v notranjosti tumorja, ki so povezane z zunajceličnim ogrodjem, odpornejše na zdravljenje v primerjavi s tistimi, ki niso v stiku z zunajceličnim ogrodjem (27, 28). To poudarja pomembnost uporabe 3D modelov pri simu-

laciji realnih pogojev in pridobivanju relevantnejših rezultatov pri raziskavah in testiranjih.

Domcke in sod. so 47 celičnih linij raka jajčnikov razvrstili glede na njihovo genetsko podobnost s HGSOC (26). Nato so Barnes in sod. z uporabo transkriptomskih podatkov 45 pogosto uporabljenih celičnih linij raka jajčnikov razvrstili v pet skupin, ki predstavljajo pet glavnih podtipov raka jajčnikov (29). Haley in sod. so sistematično proučevali nabor 2D celičnih linij HGSOC ter spremljali proliferacijo, klonogenost, fenotip, epitelno-mezenhimske transformacije in odpornost na cisplatin. Ugotovili so, da so najbolj agresivne celične linije OVCAR-5, OVCAR-8 in Kuramochi. Celična linija COV362 je bila najbolj odporna na cisplatin, medtem ko je bila Caov-3 najbolj odzivna (30). Takšna sistematična karakterizacija predstavlja dragocen vir informacij pri razvoju aplikacij, kot so modeliranje bolezni, genetske in epigenetske raziskave, temeljne raziskave, raziskave raka ter razvoj in testiranje zdravilnih učinkovin. Za 3D modele podobne karakterizacije še niso naredili.

Trenutno je visoko zmogljivo reševanje z uporabo modelov 3D celičnih kultur še vedno v razvoju, čeprav so sferoidi pokazali spodbudne rezultate, pripomogli pa so tudi k odkrivanju novih proteinskih tarč v tumorskem mikrookolju. Protokoli za pripravo 3D celičnih modelov so preprosti za



Slika 2: Primerjava 2D in 3D modelov celičnih kultur. Izdelano s pomočjo BioRender.com.

Figure 2: Comparison between 2D and 3D cell culture models. Content created by using BioRender.com.

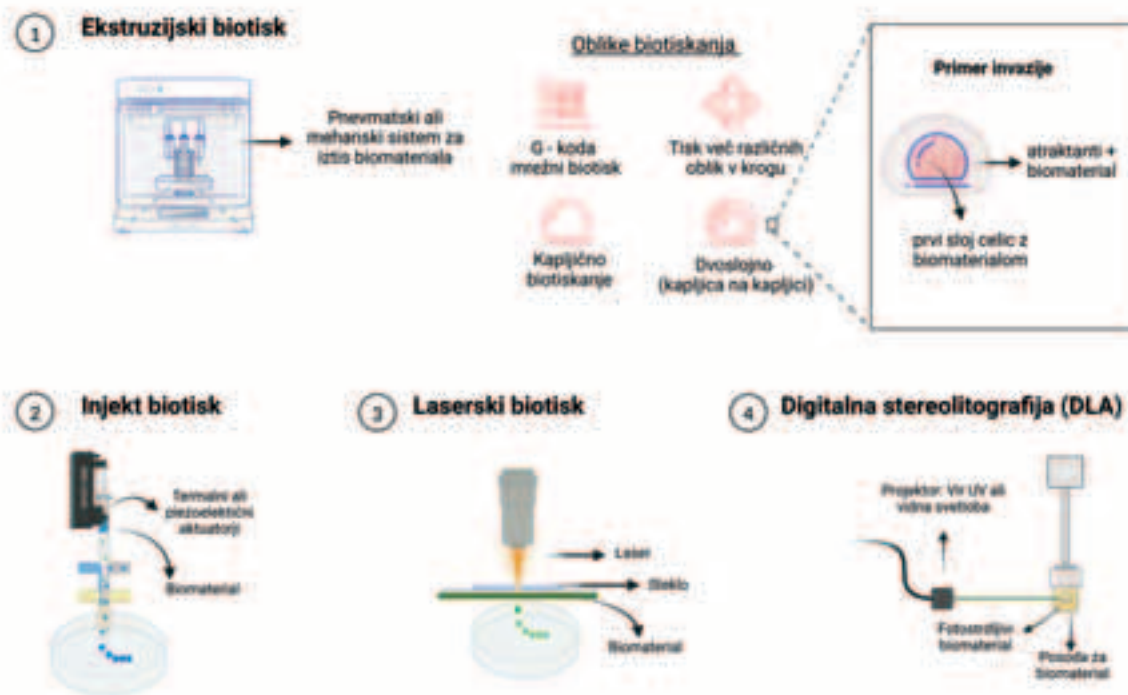
uporabo in prenosljivi na različne formate mikrotitrskih plošč, kot so plošče s 96 ali 384 vdolbinami (8, 31).

4 METODE 3D BIOTISKA

Med 3D celične modele uvrščamo večcelične tumorske sferoidne modele, sferoide rakavih matičnih celic, t. i. tumorsferoide, sferoide tumorjev, pridobljenih iz tkiv, in organotipske večcelične sferoide. 3D celične modele lahko pripravimo z ogrodjem in brez ogrodja (25). Glavni namen ogrodja je posnemanje naravnega zunajceličnega ogrodja. Le-ta celicam zagotavlja mehansko podporo, omogoča medcelično komunikacijo ter aktivira ključne celične procese (npr. adhezija, migracija, proliferacija in diferenciacija). 3D biotisk je ena izmed metod, s katero pripravljamo sferoide z ogrodjem.

3D biotisk je napredna tehnika, ki omogoča konstrukcijo kompleksnih struktur za ponazoritev naravne arhitekture tkiv *in vitro*. Od leta 2014 to metodo uporabljamo za ustvarjanje 3D modelov v laboratorijih po vsem svetu (32). Biotiskanje omogoča nadzor nad mehanskimi in biološkimi lastnostmi 3D struktur z visoko ločljivostjo v ravninah X, Y in Z. S pomočjo specializiranih biomaterialov lahko odziv ali aktivnost celic natančno prilagodimo, tako da posnemajo okolje *in vivo*. Biočrnilo za 3D biotisk je specializirana snov, ki jo uporabljamo za ustvarjanje 3D struktur z natančnim plastenjem biomaterialov, zmešanih z živimi celicami. Razvoj pri formulaciji biomaterialov, pristopih za križno povezovanje ter računalniško podprtem oblikovanju je razširil uporabo 3D biotiska na področjih tkivnega inženiringa, regenerativne medicine in presejalnih testov za zdravila (25). Poznavanje različnih metod 3D biotiska, kot so stereolitografija, inkjet biotiskanje, lasersko biotiskanje in ekstruzijski biotisk, ter razumevanje prednosti in slabosti teh metod bosta pomagala izbrati ustrezno metodo biotiska za aplikativno uporabo v znanosti (preglednica 2 in slika 3).

TEHNIKE 3D BIOTISKA



Slika 3: Grafični prikaz najpogosteje uporabljenih tehnik 3D biotiska. Izdelano s pomočjo BioRender.com.

Figure 3: Graphic representation of the most commonly used 3D bioprinting techniques. Content created by using BioRender.com.

Preglednica 2: Prednosti in slabosti različnih tehnik 3D biotiskanja.
Table 2: Advantages and disadvantages of different 3D bioprinting techniques.

Metode 3D biotiska	Viskoznost biočrnila (mPa·s)	Resolucija biotiska (µm)	Celična gostota (celic/mL)	Živost celic (%)	Prednosti	Slabosti	Referenca
Stereolitografija	< 5000	25	10^6 – 10^7	> 85	<ul style="list-style-type: none"> - brez strižnih sil na celicah - visoka natančnost tiska - izdelava kompleksnih struktur - integracija več materialov - izdelava mikrofluidnih čipov 	<ul style="list-style-type: none"> - možnost citotoksičnega vpliva - izključno fotopolimerizirajoči materiali - visoki stroški 	(33, 34)
Inkjet biotisk	3,5–12	30–50	< 10^6	70–95	<ul style="list-style-type: none"> - visoka celična preživelost - hitro biotiskanje - visokozmogljiva metoda 	<ul style="list-style-type: none"> - nizki celična gostota in viskoznost biočrnila - ne doseže uniformne velikosti kapljic - zahtevno tiskanje več različnih celičnih podtipov hkrati 	(35)
Laserski biotisk	1–8000	10–100	10^7 – 10^8	> 95	<ul style="list-style-type: none"> - brez strižnih sil na celicah - visoka natančnost tiska - izdelava kompleksnih struktur - integracija več materialov 	<ul style="list-style-type: none"> - možnost citotoksičnega vpliva - zapleten protokol za pripravo biotiskalnika - visoki stroški 	(36)
Ekstruzijski biotisk	6 – 30×10^7	200–1000	10^8	50–85	<ul style="list-style-type: none"> - visoki celična gostota in viskoznost biočrnila - večcelični modeli - koaksialno biotiskanje (mešanje dveh materialov hkrati) - izdelava kompleksnih struktur - integracija več materialov - cenovno ugodno - dostopni protokoli, razvoj 	<ul style="list-style-type: none"> - možnost poškodbe celic zaradi visokega pritiska - nizka resolucija in hitrost tiskanja materialov 	(37, 38)

Stereolitografija temelji na polimerizaciji na svetlobo občutljivega biočrnila, pri čemer kot vir osvetlitve uporabljamo ultravijolično (UV) svetlobo. UV svetloba omogoča izjemno hitro procesiranje, ki se lahko izvaja na dva različna načina. Pri tehniki, ki temelji na laserju, se strjevanje vsake plasti doseže točkovno, s pomočjo sistema za optično skeniranje (slika 3). Po drugi strani pristop digitalne svetlobne projekcije uporablja digitalno napravo z mikro ogledali za križanje celotnega prereza 3D strukture (39).

Inkjet biotiskanje vključuje nadzorovano sproščanje biočrnila na substrat s pomočjo termičnih ali zvočnih pritiskov. Termično brizgalno biotiskanje vključuje manipulacijo biočrnila s toploto (slika 3), kar povzroči njegovo izparevanje in iztis iz šobe (40).

Lasersko biotiskanje je tehnika, ki uporablja utripajoči laserski žarek na tristranski trak, sestavljen iz lasersko prepustnega stekla, lasersko absorbirajočega kovinskega sloja (na primer titana ali zlata) in biočrnila (slika 3). Ta pristop ne zahteva šobe in ne vključuje neposrednega stika. Energija laserskega žarka se absorbira v tristranskem traku, kar hitro povzroči tvorbo lokaliziranega mehurčka na nasprotni strani. Mehurček nato iztisne določeno količino biočrnila na sprejemno podlago (28).

Ekstruzijski biotisk uporablja pritisk za iztis biočrnila v nadzorovani razporeditvi (slika 3), da se ustvari zelena 3D biotiskana struktura (41). Tehnika je združljiva z različnimi biomateriali (42). Pogoji pri ekstruzijskem biotisku so dovolj mili, da omogočajo preživetje celic ter posledično uporabo široke palete celic in tkivnih konstruktov z edinstvenimi lastnostmi pri fiziološko relevantnih gostotah celic (43). Zaradi vsestranskosti, preprostosti in stroškovne učinkovitosti je ta metoda trenutno najpogosteje uporabljena metoda 3D biotiska, ki jo uporabljamo predvsem na področjih tkivnega inženirstva in regenerativne medicine (44). Ekstruzijski biotisk so uspešno uporabili za ustvarjanje *in vitro* kože, hrustanca, rekonstrukcije kolena, mišičnega tkiva, maščobnega tkiva, krvnih žil in organoidov (43, 45–47).

5 UPORABA 3D BIOTISKA ZA MODELIRANJE RAKA JAJČNIKOV

Najpogosteje uporabljena tehnika za 3D biotiskanje modela raka jajčnikov je ekstruzijski biotisk. Tehnik, ki temeljijo na principu stereolitografije, inkjet in laserskega biotiska, v literaturi do sedaj še niso opisali za modeliranje raka jajčnikov. Najpogosteje uporabljeni biomateriali so naravni poli-

meri na osnovi celuloze in kolagena, alginati in tudi polsintezni polimer želatine in metakrilata (*gelatin-methacryloyl*, GelMA).

S pomočjo ekstruzijskega biotiskalnika so znanstveniki natisnili kokulturni model in uporabili celične linije raka jajčnikov OVCAR-5 in fibroblastov MRC-5, ki so bili natisnjeni na osnovi kapljičnega biotiskanja v kombinaciji z biopolimerom. Tvorili so ponovljive večcelične konstrukte z nadzorovano velikostjo konstrukta. Ta pristop lahko služi kot inovativni kokulturni model, ki vključuje tumorske in stromalne celice ter obeta zmogljivo in robustno reševanje zdravnih učinkovin (41, 48, 49). Biotiskanje ni le koristno pri ustvarjanju biološko in fiziološko relevantnih modelov, temveč tudi omogoča konstrukcijo modelov, povezanih z normalnimi tkivi za analizo učinkovitosti in neželenih učinkov hkrati (6). Druga raziskava opisuje 3D biotiskani model raka jajčnikov, pripravljen iz želatine in alginata z vključenimi rakavimi celicami SKOV-3 in z rakom povezanimi fibroblasti (*cancer-associated fibroblasts*, CAF). Opazili so, da se celice v takem 3D modelu samodejno združujejo v agregate in da celice CAF obkrožajo rakave celice. Rezultati so pokazali, da celice na obrobju strukture bolj proliferirajo oz. se delijo v primerjavi s celicami v sredini, ker so bolj izpostavljene hranilom in kisiku, kar kaže na vzpostavitev gradienta plinov in hranil skozi biotiskane strukture, ki je ena glavnih značilnosti naravnih tumorjev (50).

Z uporabo ekstruzijskega biotiskalnika ter biomaterialov GelMA in alginata so znanstveniki leta 2021 izdelali 3D tiskan model jajčnika *in vitro*. Uporabili so komercialno dostopne celične linije COV434, KGN in ID8 ter primarne somatske celice jajčnika za izvedbo tiskanja 3D struktur z vključenimi celicami. Rezultati so pokazali, da je GelMA primeren za izdelavo 3D tiskanih struktur, saj so zadostovali kriterijem meritve higroskopnosti, kinetike razgradnje in ohranjanja oblike biomateriala. Preživetje somatskih celic jajčnikov je bilo nižje kot pri komercialnih celičnih linijah. Kljub temu je sistem 3D tiskanja na osnovi GelMA zagotavljal ustrezno mikrookolje za folikle jajčnika, ki so uspešno rasli, počili ter sprostili zrelo jajčece v opornih strukturah (51).

6 PROUČEVANJE MIGRACIJE IN INVAZIJE S POMOČJO 3D BIOTISKANJA

Razumevanje, kako rakave celice migrirajo ter kako mehanska in kemijska sestava zunajceličnega ogrodja vplivata



na migracijo, je ključno za raziskovanje metastatskega procesa, ki je odgovoren za večino smrti, povezanih z rakom. Migracijo in invazijo povezujemo z napredovanjem raka in razvili so številne metode z namenom razumevanja teh procesov, vključno z migracijskimi testi z uporabo transmembranskih komor, testi celjenja ran, testi območja izključitve celic in sledenjem celic v času pri 2D celičnih kulturah (52).

Pri nastanku metastaz raka jajčnikov se posamezne celice ali skupki celic, ki izvirajo iz tumorja, razširijo s peritonealno tekočino po trebušni votlini in tvorijo večcelične tumorske sferoide ali agregirane tumorje. Ta pojav je težko reproducirati *in vitro* z uporabo tradicionalnih 2D enoslojnih celičnih kultur, ker ne izražajo celičnih površinskih proteinov, potrebnih za tvorbo metastaz v takšni meri kot 3D celične kulture (53, 54).

Uporaba 3D biotiska kot metoda za izdelavo ogrodij v testih celične migracije ali invazije ponuja alternativo običajnim tehnikam. S pomočjo 3D biotiska lahko ustvarjamo večnamenske strukture z natančnimi oblikami, kot so kapljice, kapljica na kapljicah ali kompleksnejše oblike. Biomateriali, uporabljeni v teh testih, morajo biti kompatibilni s celičnimi linijami ter zagotavljati ustrezno prepustnost za prehajanje hranil in kisika. Po drugi strani mora imeti biomaterial dobro opredeljene mehanske lastnosti, kot so elastičnost, togost in poroznost (55). Togost izbranih polimerov, ki simulirajo zunajcelično ogrodje, ima ključno vlogo pri modeliranju invazije in migracije pri 3D modelih (56, 57). Kolagen iz zunajceličnega ogrodja, ki obdaja tumorje, je ključen za preoblikovanje tumorskega mikrookolja. V 3D modeliranju najpogosteje uporabljamo kolagen tipa I (58). V zdravem parenhimskem tkivu je območje tlaka od 440 Pa do 770 Pa (59, 60). V primeru tumorskega tkiva se tlak poviša do največ 35.000 Pa. Višja stopnja togosti v primerjavi z zdravim tkivom nastane zaradi preureditve kolagena znotraj tumorskega mikrookolja (61). Raziskovalci so ugotovili, da vključitev telopeptidnih regij na konicah molekul kolagena v strukturo biomateriala vodi do povečane togosti, kar zagotavlja večjo stabilnost znotraj kulture. Primer telopeptidnega biopolimera je TeloCol-10, sestavljen iz 95 % kolagena tipa I in 5 % kolagena tipa III. Uporaba telopeptidnih biomaterialov ima pomembno vlogo pri optimizaciji protokolov za proučevanje invazije, saj celice iz predhodno natisnjenega sferoide lahko preidejo v naslednji sloj biomateriala. S pomočjo gojitvenega medija in atraktantov lahko bolj ciljno izzovemo proces invazije in merimo časovno obdobje prehajanja celice iz točke 0 v točko 1, saj se celice premikajo v smeri atraktantov in hranil. Te aplikacije zahtevajo daljše inkubacijske čase za opazovanje celičnega

obnašanja. Uporabne so tudi za spremljanje učinka dodatnih zdravilnih učinkovin (62).

7 SKLEP

Področje 3D biotiska je v zadnjih petih letih doseglo znaten tehnološki napredek in postalo najobetavnejši pristop za razvoj 3D konstruktov tumorskega tkiva, ki jih je mogoče uporabiti kot modele za proučevanje biologije raka in reševanje novih zdravilnih učinkovin. V primerjavi z 2D modeli 3D modeli raka natančneje reproducirajo značilnosti dejanskih tumorjev, vključno z interakcijami med celicami ter med celicami in zunajceličnim ogrodjem. Biotiskanje ima potencial za izboljšanje modeliranja tumorskega mikrookolja *in vitro* na področju 3D modelov. Izbor tehnike biotiskanja temelji na različnih kriterijih, vključno z vrsto uporabljenih biomaterialov, zelenimi dimenzijami, obliko in kompleksnostjo izdelanih modelov *in vitro*. Biotisk omogoča natančno razporeditev različnih celic z biomaterialom, kar vodi v ustvarjanje zapletenih 3D struktur, ki posnemajo mikroarhitekturo tumorja, in je lahko uporaben pri proučevanju molekularnih in bioloških vzrokov raka. Vključitev tehnologije 3D biotiska za pripravo ponovljivega 3D modela raka jajčnikov bo omogočila hitro in učinkovito testiranje več zdravilnih učinkovin. Obstoječe metode biotiskanja je mogoče še izboljšati, ustvariti nove biomaterialne in doseči pravo ravnovesje med biološkimi in mehanskimi dejavniki za ustvarjanje zapletenejših in bolj realističnih modelov raka *in vitro*. Dodatno bi lahko tehnike 3D biotiskanja napredovale v četrto dimenzijo z uporabo pametnih materialov in nanodelcev, ki se lahko odzovejo na zunanje dražljaje. To bi omogočilo simulacijo različnih stopenj raka s programiranjem širjenja in/ali razgradnje hidrogelnega matriksa.

8 IZJAVA

Pregledni članek je rezultat sodelovanja avtoric Vesne Kokondoske Grgič, Maše Sinreih in Ivane Jovčevske v sklopu aplikativnega projekta L4-4565 in programa P1-0390, financiranih s strani ARIS. Pregledni članek je tudi rezultat sodelovanja prof. Boruta Štruklja in Vesne Kokondoske Grgič med doktorskim usposabljanjem.

9 LITERATURA

1. Bast RC, Jr., Hennessey B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(6):415-28.
2. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(4):284-96.
3. IAFo C. Globocan 2020 2020 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/25-Ovary-fact-sheet.pdf>].
4. Aletti GD, Gallenberg MM, Cliby WA, Jatoi A, Hartmann LC. Current management strategies for ovarian cancer. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(6):751-70.
5. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Jr., Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(10):719-25.
6. Liu T, Delavaux C, Zhang YS. 3D bioprinting for oncology applications. *J 3D Print Med*. 2019;3(2):55-8.
7. Wu R, Hendrix-Lucas N, Kuick R, Zhai Y, Schwartz DR, Akyol A, et al. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer cell*. 2007;11(4):321-33.
8. 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.
9. Belfiore L, Aghaei B, Law AMK, Dobrowolski JC, Raftery LJ, Tjandra AD, et al. Generation and analysis of 3D cell culture models for drug discovery. *Eur J Pharm Sci*. 2021;163:105876.
10. Ciucci A, Buttarelli M, Fagotti A, Scambia G, Gallo D. Preclinical models of epithelial ovarian cancer: practical considerations and challenges for a meaningful application. *CMLS*. 2022;79(7):364.
11. Lee JM, Mhawech-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.
12. Loessner D, Holzapfel BM, Clements JA. Engineered microenvironments provide new insights into ovarian and prostate cancer progression and drug responses. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;79-80:193-213.
13. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015;17(1):1-15.
14. White EA, Kenny HA, Lengyel E. Three-dimensional modeling of ovarian cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;79-80:184-92.
15. 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.
16. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(2):151-6.
17. Palmirotta R, Silvestris E, D'Oronzo S, Cardascia A, Silvestris F. Ovarian cancer: Novel molecular aspects for clinical assessment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;117:12-29.
18. Chen X, Wu Y, Dong H, Zhang CY, Zhang Y. Platinum-based agents for individualized cancer treatment. *Curr Mol Med*. 2013;13(10):1603-12.
19. Banerjee S, Gonzalez-Martin A, Harter P, Lorusso D, Moore KN, Oaknin A, et al. First-line PARP inhibitors in ovarian cancer: summary of an ESMO Open - Cancer Horizons round-table discussion. *ESMO open*. 2020;5(6):e001110.
20. Wu JWY, Dand S, Doig L, Papenfuss AT, Scott CL, Ho G, et al. T-Cell Receptor Therapy in the Treatment of Ovarian Cancer: A Mini Review. *Front Immunol*. 2021;12:672502.
21. Daigre J, Martinez-Osuna M, Bethke M, Steiner L, Dittmer V, Krischer K, et al. Preclinical Evaluation of Novel Folate Receptor 1-Directed CAR T Cells for Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024;16(2).
22. Deng M, Tang F, Chang X, Liu P, Ji X, Hao M, et al. Immunotherapy for Ovarian Cancer: Disappointing or Promising? *Mol Pharmaceutics*. 2024;21(2):454-66.
23. 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).
24. 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.
25. Zottel A, Kokondoska Grgič V, Sinreih M. 3D celični modeli in njihova uporaba pri testiranju protirakavih zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn*. 2023;74(5):362-70.
26. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun*. 2013;4:2126.
27. Ipek S, Ustundag A, Can Eke B. Three-dimensional (3D) cell culture studies: a review of the field of toxicology. *Drug Chem Toxicol*. 2023;46(3):523-33.
28. Law AMK, Rodriguez de la Fuente L, Grundy TJ, Fang G, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D. Advancements in 3D Cell Culture Systems for Personalizing Anti-Cancer Therapies. *Front Oncol*. 2021;11:782766.
29. Barnes BM, Nelson L, Tighe A, Burghel GJ, Lin IH, Desai S, et al. Distinct transcriptional programs stratify ovarian cancer cell lines into the five major histological subtypes. *Genome Med*. 2021;13(1):140.
30. Haley J, Tomar S, Pulliam N, Xiong S, Perkins SM, Karpf AR, et al. Functional characterization of a panel of high-grade serous ovarian cancer cell lines as representative experimental models of the disease. *Oncotarget*. 2016;7(22):32810-20.
31. Kurman RJ, Shih Ie M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *AJP*. 2016;186(4):733-47.
32. Hoch E, Tovar GE, Borchers K. Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014;46(5):767-78.
33. Miri AK, Nieto D, Iglesias L, Goodarzi Hosseinabadi H, Maharjan S, Ruiz-Esparza GU, et al. Microfluidics-Enabled Multimaterial Maskless Stereolithographic Bioprinting. *Adv Mater*. 2018;30(27):e1800242.
34. Grigoryan B, Sazer DW, Avila A, Albritton JL, Padhye A, Ta AH, et al. Development, characterization, and applications of multi-material stereolithography bioprinting. *Sci Rep*. 2021;11(1):3171.
35. Zhang J, Chen F, He Z, Ma Y, Uchiyama K, Lin JM. A novel approach for precisely controlled multiple cell patterning in microfluidic chips by inkjet printing and the detection of drug metabolism and diffusion. *The Analyst*. 2016;141(10):2940-7.
36. Dou C, Perez V, Qu J, Tsin A, Xu B, Li J. A State-of-the-Art Review of Laser-Assisted Bioprinting and its Future Research Trends. *ChemBioEng Reviews*. 2021;8.
37. Malekpour A, Chen X. Printability and Cell Viability in Extrusion-Based Bioprinting from Experimental, Computational, and Machine Learning Views. *J Funct Biomater*. 2022;13(2).

38. Ramesh S, Harrysson OLA, Rao PK, Tamayol A, Cormier DR, Zhang Y, et al. Extrusion bioprinting: Recent progress, challenges, and future opportunities. *Bioprinting*. 2021;21:e00116.
39. Skoog SA, Goering PL, Narayan RJ. Stereolithography in tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med*. 2014;25(3):845-56.
40. Cui X, Boland T, D'Lima DD, Lotz MK. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2012;6(2):149-55.
41. Cui H, Nowicki M, Fisher JP, Zhang LG. 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(1).
42. Ma X, Liu J, Zhu W, Tang M, Lawrence N, Yu C, et al. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;132:235-51.
43. Placone JK, Engler AJ. Recent Advances in Extrusion-Based 3D Printing for Biomedical Applications. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(8):e1701161.
44. Idaszek J, Costantini M, Karlsen TA, Jaroszewicz J, Colosi C, Testa S, et al. 3D bioprinting of hydrogel constructs with cell and material gradients for the regeneration of full-thickness chondral defect using a microfluidic printing head. *Biofabrication*. 2019;11(4):044101.
45. Tarassoli SP, Jessop ZM, Al-Sabah A, Gao N, Whitaker S, Doak S, et al. Skin tissue engineering using 3D bioprinting: An evolving research field. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2018;71(5):615-23.
46. Datta P, Ayan B, Ozbolat IT. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. *Acta Biomater*. 2017;51:1-20.
47. You F, Eames BF, Chen X. Application of Extrusion-Based Hydrogel Bioprinting for Cartilage Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).
48. Trivedi P, Liu R, Bi H, Xu C, Rosenholm JM, Akerfelt M. 3D Modeling of Epithelial Tumors-The Synergy between Materials Engineering, 3D Bioprinting, High-Content Imaging, and Nanotechnology. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12).
49. Xu F, Celli J, Rizvi I, Moon S, Hasan T, Demirci U. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnol J*. 2011;6(2):204-12.
50. Baka Z, Godier C, Lamy L, Mallick A, Gribova V, Figarol A, et al. A Coculture Based, 3D Bioprinted Ovarian Tumor Model Combining Cancer Cells and Cancer Associated Fibroblasts. *Macromol Biosci*. 2023;23(3):e2200434.
51. Wu T, Gao YY, Su J, Tang XN, Chen Q, Ma LW, et al. Three-dimensional bioprinting of artificial ovaries by an extrusion-based method using gelatin-methacryloyl bioink. *Climacteric*. 2022;25(2):170-8.
52. Kramer N, Walz A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschlager M, et al. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res*. 2013;752(1):10-24.
53. Chaicharoenaudomrung N, Kunhorn P, Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J Stem Cells*. 2019;11(12):1065-83.
54. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266-77.
55. Ramiah P dTL, Choonara YE, Kondiah PPD, Pillay V. Hydrogel-Based Bioinks for 3D Bioprinting in Tissue Regeneration. *Front Mater*. 2020;7:76.
56. Acerbi I, Cassereau L, Dean I, Shi Q, Au A, Park C, et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol (Camb)*. 2015;7(10):1120-34.
57. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139(5):891-906.
58. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO reports*. 2014;15(12):1243-53.
59. Bourgot I, Primac I, Louis T, Noel A, Maquoi E. Reciprocal Interplay Between Fibrillar Collagens and Collagen-Binding Integrins: Implications in Cancer Progression and Metastasis. *Front Oncol*. 2020;10:1488.
60. de Hilster RHJ, Sharma PK, Jonker MR, White ES, Gercama EA, Roobeek M, et al. Human lung extracellular matrix hydrogels resemble the stiffness and viscoelasticity of native lung tissue. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020;318(4):L698-L704.
61. Sohutskey DO, Puls TJ, Voytik-Harbin SL. Collagen Self-assembly: Biophysics and Biosignaling for Advanced Tissue Generation. In: Zhang Y, editor. *Multi-scale Extracellular Matrix Mechanics and Mechanobiology*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 203-45.
62. Takata M, Maniwa Y, Doi T, Tanaka Y, Okada K, Nishio W, et al. Double-layered collagen gel hemisphere for cell invasion assay: successful visualization and quantification of cell invasion activity. *Cell Commun Adhes*. 2007;14(4):157-67.