

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Jelena S. Petrović

**BIOMIMIČNI 3D SISTEM ZA GAJENJE
MALIGNIH ĆELIJA I POUZDANO ISPITIVANJE
ANTITUMORSKIH LEKOVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Jelena S. Petrović

**A BIOMIMETIC 3D SYSTEM FOR CANCER
CELL CULTURES AND RELIABLE
ANTICANCER DRUG TESTING**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentori:

dr Bojana Obradović, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Jasmina Stojkowska, viši naučni saradnik
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

dr Melina Kalagasidis Krušić, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Rada Pjanović, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Miodrag Dragoj, viši naučni saradnik
Univerziteta u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Datum odbrane: _____

Najiskreniju zahvalnost na stručnom vođenju, podršci, dragocnim savetima i ukazanom poverenju tokom izrade ove doktorske disertacije dugujem svojim mentorima, prof. Bojani Obradović i dr Jasmini Stojkovskoj.

Takođe, iskreno se zahvaljujem članovima komisije, prof. Melini Kalagasidis Krušić, prof. Radi Pjanović i dr Miodragu Dragoju, na pažljivom čitanju doktorske disertacije, konstruktivnim komentarima i stručnim savetima koji su doprineli unapređenju kvaliteta ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Mileni Milivojević, Luki Bojić, dr Miodragu Dragoju, dr Sofiji Jovanović Stojanov, prof. Radmili Janković, dr Elžbijeti Pančišin i prof. Marku Koracariju na izuzetnoj saradnji i značajnom doprinosu realizaciji ovog istraživanja.

Zahvaljujem se i svim kolegama sa katedre za Hemijsko inženjerstvo i katedre za Neorgansku hemijsku tehnologiju na prijatnoj saradnji i podršci, a posebnu zahvalnost dugujem Mii Milošević, Ivani Banićević, Mariji Pavlović, dr Jovani Zvicer, dr Jasmini Stojkovskoj, dr Andrei Osmokrović, dr Predragu Petroviću i dr Tamari Matić na velikoj pomoći, podršci, međusobnom poverenju i prijateljstvu, kojima su ovaj put učinili lepšim i lakšim.

Na kraju, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na bezuslovnoj podršci i veri u mene, bez kojih ovaj put ne bi bio moguć.

Jelena Petrović

BIOMIMIČNI 3D SISTEM ZA GAJENJE MALIGNIH ĆELIJA I POUZDANO ISPITIVANJE ANTITUMORSKIH LEKOVA

SAŽETAK

Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj i validacija jednostavnog biomimičnog 3D modela za gajenje malignih ćelija zasnovanog na alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim ćelijama, za primenu u istraživanju malignih tumora i pretkliničkom ispitivanju antitumorskih lekova. Određeni su optimalni uslovi za dobijanje Ca-alginatnih mikrovlakana sa i bez dodatka čestica hidroksiapatita, kao i Ba-alginatnih mikrovlakana, sa imobilisanim ćelijama različitih ćelijskih linija glioma, osteosarkoma i karcinoma pluća. Pokazano je da umerena brzina istiskivanja od $\sim 2,5 \text{ m s}^{-1}$ i smicajni naponi $\sim 10 \text{ kPa}$ ne smanjuju vijabilnost ćelija. Analizom prenosa mase pokazano je da protočni uslovi postaju značajni tek za transport molekula sa veoma malim koeficijentom difuzije ($\sim 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), tako da statični uslovi omogućavaju uspešno gajenje ispitivanih malignih ćelija.

Model je omogućio gajenje različitih malignih ćelija do 21 dana uz očuvanje vijabilnosti, proliferacije i morfoloških karakteristika, kao i formiranje višćelijskih agregata. U produženim kulturama uočeni su sinteza retikulinskih vlakana i razvoj nekrotičnih regiona u velikim agregatima.

U poređenju sa 2D kulturama, ćelije u 3D modelu pokazale su veću rezistenciju na standardne antitumorske lekove i promene u ekspresiji gena povezanih sa multirezistencijom. Matematičko modelovanje potvrdilo je da brzina difuzije lekova kroz alginatna mikrovlakna ne ograničava efikasan prenos do svih ćelija, tako da razlike u odgovoru na lekove proizlaze iz bioloških karakteristika 3D kultura.

Razvijeni 3D model predstavlja jednostavan, reproduktivan i isplativ sistem koji oponaša ključne karakteristike tumorskog mikrookruženja i omogućava relevantnije ispitivanje biologije malignih tumora i odgovora ćelija na lekove u odnosu na 2D kulture.

Ključne reči: 3D *in vitro* model, alginatna mikrovlakna, maligni tumori, imobilisane ćelije, tumorsko mikrookruženje, rezistencija na lekove, pretklinično ispitivanje, biomaterijali, matematičko modelovanje

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

A BIOMIMETIC 3D SYSTEM FOR CANCER CELL CULTURES AND RELIABLE ANTICANCER DRUG TESTING

ABSTRACT

The aim of this doctoral dissertation was the development and validation of a simple biomimetic 3D model for culturing cancer cells based on alginate microfibers with immobilized cells, for application in cancer research and preclinical anticancer drug testing. Optimal conditions were established for the fabrication of Ca-alginate microfibers with and without hydroxyapatite particles, as well as Ba-alginate microfibers, containing immobilized glioma, osteosarcoma, and lung cancer cell lines. Moderate extrusion velocity ($\sim 2.5 \text{ m s}^{-1}$), corresponding to shear stresses of $\sim 10 \text{ kPa}$, was shown not to compromise cell viability. Mass transport analysis demonstrated that flow conditions become relevant only for the transport of molecules with very low diffusion coefficients ($\sim 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), whereas static conditions were sufficient to support successful culture of the investigated cancer cells.

The model supported culture of different cancer cell types for up to 21 days while preserving cell viability, proliferation, and morphological characteristics, as well as the formation of multicellular aggregates. Extended cultures exhibited reticulin fiber formation and the development of necrotic regions within large aggregates.

Compared with 2D cultures, cells grown in the 3D model exhibited increased resistance to standard anticancer drugs and altered expression of genes associated with multidrug resistance. Mathematical modeling confirmed that drug diffusion through alginate microfibers does not limit efficient drug transport to all cells, indicating that differences in drug response arise from the biological properties of the 3D cultures.

The developed 3D model represents a simple, reproducible, and cost-effective system that mimics key features of the tumor microenvironment and enables more relevant investigation of cancer biology and cellular responses to drugs compared with conventional 2D cultures.

Key words: 3D *in vitro* model, alginate microfibers, cancer, immobilized cells, tumor microenvironment, drug resistance, preclinical studies, biomaterials, mathematical modeling

Scientific field: Technology and Engineering

Scientific subfield: Chemical Engineering

SADRŽAJ

UVOD	1
1. TEORIJSKE OSNOVE.....	2
1.1. Maligni tumori.....	2
1.1.1. Biološke karakteristike malignih tumora	2
1.1.2. Tumorsko mikrokruženje	2
1.1.3. Osteosarkom.....	4
1.1.3.1. Epidemiologija i opšte karakteristike osteosarkoma.....	4
1.1.3.2. Sastav i struktura koštanog tkiva	4
1.1.3.3. Biološke karakteristike i mikrokruženje osteosarkoma	5
1.1.3.4. Terapija osteosarkoma.....	6
1.1.4. Gliom.....	6
1.1.4.1. Epidemiologija i opšte karakteristike glioma.....	6
1.1.4.2. Sastav i struktura nervnog tkiva.....	7
1.1.4.3. Biološke karakteristike i mikrokruženje glioma	8
1.1.4.4. Terapija glioma	9
1.1.5. Karcinom pluća	10
1.1.5.1. Epidemiologija i opšte karakteristike karcinoma pluća	10
1.1.5.2. Sastav i struktura pluća	10
1.1.5.3. Biološke karakteristike i mikrokruženje plućnog karcinoma	10
1.1.5.4. Terapija karcinoma pluća	11
1.2. Antitumorski lekovi.....	12
1.2.1. Multirezistencija na antitumorske lekove	12
1.2.2. Mehanizmi delovanja odabranih antitumorskih lekova	13
1.3. Inženjerstvo tumora.....	14
1.3.1. Koncept inženjerstva tumora.....	14
1.3.2. Značaj 3D modela u ispitivanju antitumorskih lekova	14
1.4. 3D <i>in vitro</i> modeli malignih tumora.....	16
1.4.1. Modeli bez nosača.....	16
1.4.1.1. Sferoidi.....	16
1.4.1.2. Organoidi	17
1.4.2. Modeli zasnovani na nosačima	18
1.4.2.1. Biomaterijali.....	18
1.4.2.1.1. Polimerni biomaterijali	18
1.4.2.1.2. Keramički biomaterijali	19
1.4.2.1.3. Kompozitni biomaterijali	19
1.4.2.1.4. Decelularizovani vanćelijski matriks	20

1.4.2.2. Metode imobilizacije ćelija	20
1.4.2.2.1. Adsorpcija na površini nosača	20
1.4.2.2.2. Zadržavanje unutar matriksa	21
1.4.2.3. Karakteristike nosača	23
1.4.2.3.1. Struktura	23
1.4.2.3.2. Topografija	24
1.4.2.3.3. Mehaničke karakteristike	24
1.4.2.4. Alginat	25
1.4.2.4.1. Hemijska struktura alginata	25
1.4.2.4.2. Mehanizam formiranja hidrogela	26
1.4.2.4.3. Stabilnost jonsko umreženih alginatnih hidrogelova	28
1.4.2.4.4. Alginat kao nosač ćelija u 3D kulturama	29
1.4.3. Modeli zasnovani na uređajima	29
1.4.3.1. Mikrofluidni sistemi	29
1.4.3.2. Biomimetični bioreaktorski sistemi	30
1.4.3.2.1. Protočni bioreaktori	31
1.4.4. pristupi razvoju 3D <i>in vitro</i> modela osteosarkoma, glioma i karcinoma pluća	31
1.4.4.1. Osteosarkom	31
1.4.4.2. Gliom	32
1.4.4.3. Karcinom pluća	33
1.4.4.4. Potencijal i ograničenja 3D <i>in vitro</i> modela malignih tumora	34
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
3. MATERIJALI I METODE	36
3.1. Materijali	36
3.2. Ćelijske linije i ćelijska kultura	36
3.3. Dobijanje alginatnih mikrovlakana	37
3.3.1. Dobijanje alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama	37
3.3.1.1. Imobilizacija C6 ćelijske linije u Ca-alginatna mikrovlakna	37
3.3.1.2. Imobilizacija HOS i U2OS ćelijskih linija u Ca-alginatna mikrovlakna	37
3.3.1.2.1. Imobilizacija HOS sferoida u Ca-alginatna mikrovlakna	37
3.3.1.3. Imobilizacija K7M2-wt ćelijske linije u Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakna	38
3.3.1.4. Imobilizacija NCI-H460 ćelijske linije u Ca-alginatna i Ba-alginatna mikrovlakna	38
3.3.2. Dobijanje kontrolnih Ca-alginatnih mikrovlakana bez ćelija	38
3.4. Gajenje imobilisanih ćelija u statičnim uslovima	38
3.5. Gajenje imobilisanih ćelija u protočnom biorektoru	39
3.6. Tretman 2D i 3D ćelijskih kultura antitumorskim lekovima	41

3.6.1. Tretman 2D i 3D NCI-H460 ćelijskih kultura cisplatinom, etopozidom i vinorelbinom.....	41
3.6.2. Tretman 2D i 3D K7M2-wt ćelijskih kultura doksorubicinom.....	42
3.7. Eksperiment za određivanje intersticijalne brzine medijuma kroz mikrovlakna u protočnim uslovima.....	42
3.7.1. Dobijanje kompozitnih Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom.....	42
3.7.2. Ispitivanje otpuštanja srebra iz kompozitnih Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom	43
3.7.3. Određivanje koncentracije srebra.....	43
3.8. Analitičke metode	43
3.8.1. Određivanje koncentracije i vijabilnosti imobilisanih ćelija.....	43
3.8.2. Histopatološka analiza	44
3.8.3. Određivanje prečnika mikrovlakana i veličine agregata	44
3.8.4. Imunofluorescentna citohemijska analiza	44
3.8.5. <i>Live/Dead</i> esej.....	44
3.8.6. MTT test.....	45
3.8.7. Analiza genske ekspresije	46
3.8.7.1. Izolacija RNK	46
3.8.7.2. Tretman DNK-azom i reakcija reverzne transkripcije	47
3.8.7.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR).....	47
3.8.8. Statistička analiza rezultata	48
4. REZULTATI.....	49
4.1. Dobijanje mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama	49
4.1.1. Optimizacija koncentracije ćelija u ćelijskoj suspenziji u Na-alginatnom rastvoru	49
4.1.2. Optimizacija koncentracije rastvora Na-alginata i sastava rastvora za geliranje.....	51
4.1.2.1. Optimizacija koncentracije rastvora Na-alginata za dobijanje Ca-alginatnih mikrovlakana.....	51
4.1.2.2. Optimizacija koncentracije Na-alginata i sastava rastvora za geliranje za dobijanje Ba-alginatnih mikrovlakana.....	51
4.1.3. Optimizacija uslova istiskivanja i dužine geliranja.....	53
4.2. Optimizacija uslova gajenja ćelija.....	56
4.2.1. Ispitivanje uticaja hidrodinamičkih uslova gajenja ćelija na 3D kulture C6 ćelijske linije u Ca-alginatnim mikrovlaknima	56
4.2.1.1. Matematičko modelovanje prenosa mase u protočnom bioreaktoru	58
4.2.1.1.1. Matematičko modelovanje otpuštanja srebra iz Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom	58
4.2.1.1.2. Matematičko modelovanje prenosa mase kroz mikrovlakno sa imobilisanim ćelijama.....	61
4.2.1.1.2.1. Matematičko modelovanje prenosa kiseonika	63
4.2.1.1.2.2. Matematičko modelovanje prenosa transferina	64

4.2.2. Ispitivanje uticaja hidrodinamičkih uslova gajenja ćelija na 3D kulture NCI-H460 ćelijske linije u Ba-alginatnim mikrovlaknima	66
4.3. Gajenje malignih ćelija u alginatnim mikrovlaknima	68
4.3.1. Kratkotrajne kulture NCI-H460 ćelijske linije u Ba-alginatnim mikrovlaknima	68
4.3.2. Dugotrajne kulture U2OS ćelijske linije u Ca-alginatnim mikrovlaknima.....	69
4.3.3. Dugotrajne kulture HOS ćelijske linije u Ca-alginatnim mikrovlaknima.....	70
4.3.4. Dugotrajne kulture HOS sferoida u Ca-alginatnim mikrovlaknima	71
4.3.5. Dugotrajne kulture K7M2-wt ćelijske linije u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima	72
4.4. Ispitivanje efekta antitumorskih lekova na 2D i 3D ćelijske kulture	78
4.4.1. Tretman 2D i 3D kultura NCI-H460 ćelija u Ba-alginatnim mikrovlaknima cisplatinom.....	78
4.4.2. Tretman 2D i 3D kultura NCI-H460 ćelija u Ba-alginatnim mikrovlaknima etopozidom.....	80
4.4.3. Tretman 2D i 3D kultura NCI-H460 ćelija u Ba-alginatnim mikrovlaknima vinorelbinom.....	81
4.4.4. Ekspresija gena <i>MDR1</i> , <i>ABCC1</i> i <i>ABCG2</i> u NCI-H460 ćelijama gajenim u 2D i 3D kulturama nakon tretmana antitumorskim lekovima	82
4.4.5. Tretman 2D i 3D kultura K7M2-wt ćelija u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima doksorubicinom	83
4.4.6. Matematičko modelovanje prenosa doksorubicina.....	85
5. DISKUSIJA.....	88
6. ZAKLJUČAK	96
7. LITERATURA	98

UVOD

Maligni tumori predstavljaju drugi vodeći uzrok smrtnosti u svetu, zbog čega razvoj efikasnih antitumorskih lekova spada među najveće izazove savremene medicine. Iako su brojna istraživanja fokusirana na pronalaženje novih terapija, njihov uspeh u kliničkim ispitivanjima ostaje veoma mali. Jedan od glavnih razloga za to je biološka raznolikost malignih tumora, koja dovodi do izrazito varijabilnog odgovora na terapiju i otežava razvoj univerzalnog leka koji bi bio efikasan protiv svih tipova ovih tumora (*Dagogo-Jack i Shaw, 2017*). Pored toga, u pretkliničkim ispitivanjima se efikasnost lekova najčešće procenjuje pomoću tradicionalnih, dvodimenzionalnih (2D) ćelijskih kultura, praćenih testiranjima na životinjama. Ove metode, uprkos značajnim ograničenjima, i dalje čine osnovu testiranja pre nego što lekovi pređu u kliničku fazu ispitivanja. S jedne strane, 2D ćelijske kulture omogućavaju jednostavnu upotrebu i velike kapacitete analiza i produktivnosti, ali ne mogu verno da reprodukuju kompleksno mikrokruženje tumora koje utiče na proliferaciju, migraciju i metabolizam ćelija, a time i na njihov odgovor na terapiju (*Pampaloni i sar., 2007; Trédan i sar., 2007*). S druge strane, životinjski modeli obezbeđuju realističnije okruženje tumora, međućelijske interakcije i interakcije ćelija sa vanćelijskim matriksom, ali su ovi eksperimenti skupi, komplikovani i povlače etička pitanja (*Day i sar., 2015; Cekanova i Rathore, 2014*). Dodatno, zbog fizioloških i genetskih razlika između životinja i ljudi, ovi modeli često ne uspevaju da u potpunosti reprodukuju biologiju humanih malignih tumora, što dovodi do značajnih razlika u efikasnosti lekova između pretkliničkih i kliničkih faza ispitivanja (*Mak i sar., 2014*). Naime, čak 90 % eksperimentalnih lekova koji stignu do prve faze kliničkih ispitivanja ne pokaže zadovoljavajuću efikasnost i bezbednost (*Sun i sar., 2022*), što jasno ukazuje na potrebu za razvojem pouzdanijih pretkliničkih modela.

Inženjerstvo tumora se upravo fokusira na ovaj problem bazirajući se na razvoju biomimičnih trodimenzionalnih (3D) *in vitro* modela čiji je cilj preciznije oponašanje tumora *in vivo*. Ovi modeli obezbeđuju trodimenzionalno okruženje koje omogućava međućelijske interakcije, kao i interakcije između ćelija i vanćelijskog matriksa, karakteristične za tumorsko tkivo. Na taj način omogućava se izučavanje ponašanja i razvoja tumora, kao i odgovora na terapije u relevantnim uslovima, čime se povećava prediktivna moć *in vitro* testiranja i smanjuje jaz u odnosu na klinička ispitivanja.

Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj i validacija jednostavnog, relevantnog i pouzdanog biomimičnog 3D modela zasnovanog na alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim ćelijama, pogodnog za gajenje različitih tipova malignih ćelija i pretkliničku evaluaciju antitumorskih lekova. Teorijski deo ove disertacije obuhvata biološke karakteristike malignih tumora i njihovo mikrokruženje, sa posebnim osvrtom na osteosarkom, gliom i karcinom pluća. Takođe, prikazane su osnove razvoja antitumorskih lekova, kao i koncept i značaj inženjerstva tumora u razvoju savremenih 3D *in vitro* modela. Posebna pažnja posvećena je klasifikaciji i karakteristikama 3D *in vitro* modela zasnovanih na ćelijama, biomaterijalima i uređajima, uključujući alginat kao odabrani biomaterijal za dobijanje mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama. Na kraju, dat je pregled savremenih 3D *in vitro* modela osteosarkoma, glioma i karcinoma pluća i njihove primene u pretkliničkom ispitivanju antitumorskih lekova.

1. TEORIJSKE OSNOVE

1.1. Maligni tumori

Maligni tumori predstavljaju heterogenu grupu bolesti koje nastaju kao rezultat nekontrolisane proliferacije izmenjenih ćelija. Njihov razvoj zavisi od složenih interakcija između tumorskih ćelija i mikrookruženja u kojem se nalaze. Razumevanje osnovnih bioloških karakteristika malignih tumora predstavlja osnovu za proučavanje mehanizama njihove progresije i razvoj savremenih *in vitro* modela.

1.1.1. Biološke karakteristike malignih tumora

Maligni tumori se odlikuju skupom stečenih sposobnosti koje ih jasno razlikuju od normalnog tkiva. Ove karakteristike obuhvataju: 1) održavanje proliferativne signalizacije, 2) neosetljivost na inhibitore rasta, 3) izbegavanje ćelijske smrti, 4) sticanje neograničenog proliferativnog potencijala, 5) sposobnost indukcije angiogeneze, 6) sposobnost invazije i metastaziranja, 7) metaboličko reprogramiranje i 8) izbegavanje eliminacije od strane imunskog sistema (Hanahan, 2022).

Nekontrolisana proliferacija ćelija predstavlja jednu od osnovnih odlika malignih tumora i rezultat je kombinovanog dejstva više navedenih karakteristika, pre svega održavanja proliferativne signalizacije, neosetljivosti na inhibitore rasta, izbegavanja ćelijske smrti i sticanja neograničenog proliferativnog potencijala. U normalnim uslovima, ćelijama je potrebno prisustvo spoljašnjih mitogenih signala kako bi započele proliferaciju, dok tumorske ćelije stiču sposobnost održavanja proliferativne signalizacije nezavisno od ovih stimulusa, često sopstvenom sintezom faktora rasta ili njihovom stalnom aktivacijom. Istovremeno, tumorske ćelije su sposobne da naruše regulaciju signalnih puteva koji kontrolišu ćelijski ciklus i na taj način postanu neosetljive na antiproliferativne signale koji u normalnim tkivima održavaju ćelije u stanju mirovanja, što dovodi do njihovog nekontrolisanog prelaska u proliferativno stanje. Pored toga, rast ovih ćelija je dodatno omogućen sposobnošću izbegavanja programirane ćelijske smrti (apoptoze). Naime, uprkos tome što narušavanje ćelijske kontrole i signali iz okruženja primarno indukuju apoptozu, maligne ćelije uspešno zaobilaze ove regulatorne pritiske, čime obezbeđuju svoj opstanak. Za razliku od normalnih ćelija koje imaju ograničen broj deoba i nakon toga ulaze u stanje senescencije (trajnog prestanka rasta), tumorske ćelije mogu da prevaziđu ovo ograničenje i steknu neograničen proliferativni potencijal, što predstavlja ključni korak u razvoju malignih tumora i omogućava formiranje velikih tumorskih masa (Hanahan i Weinberg, 2000).

Indukcija angiogeneze predstavlja jednu od ključnih stečenih sposobnosti tumora, neophodnu za njihov dalji rast i progresiju. Kako tumori rastu, naglo povećanje broja metabolički aktivnih malignih ćelija stvara ogromnu potrebu za kiseonikom i hranljivim materijama. Ćelije koje ostaju udaljene od postojećih kapilara izložene su nedostatku kiseonika i nutrijenata, što predstavlja ključni stimulus za indukciju angiogeneze i omogućava formiranje nove vaskularne mreže neophodne za opstanak i dalji rast tumorske mase (Hanahan i Weinberg, 2011).

Tokom razvoja tumora dolazi i do značajnih metaboličkih i imunoloških promena koje dodatno doprinose njegovoj progresiji. Tumorske ćelije menjaju način energetskog metabolizma kako bi mogle da podrže kontinuirani rast i proliferaciju, prilagođavajući se potrebama ubrzanog ćelijskog deljenja. Dodatno, stiču sposobnost da izbegnu prepoznavanje i eliminaciju od strane imunskog sistema, čime omogućavaju sopstveni opstanak i progresiju (Hanahan i Weinberg, 2011).

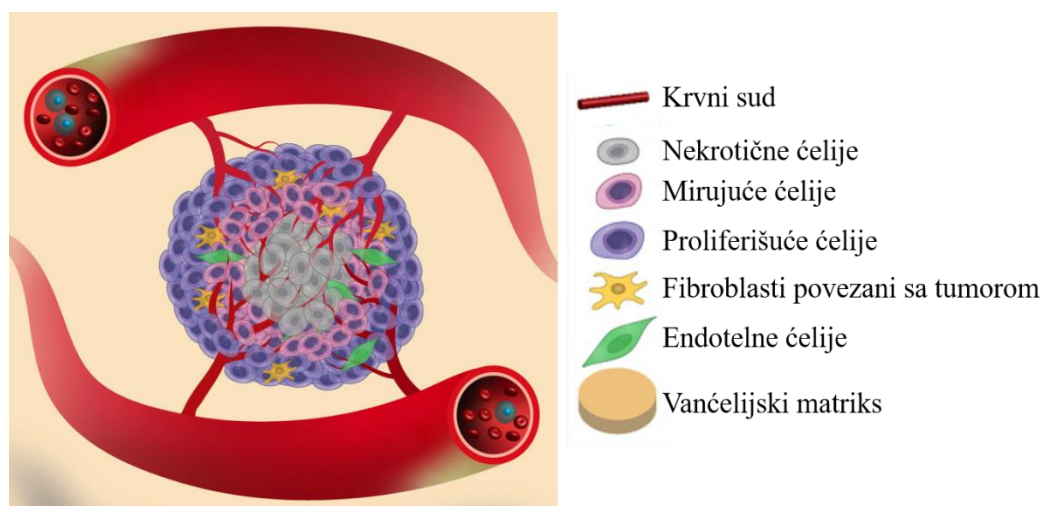
1.1.2. Tumorsko mikrookruženje

Tumorsko mikrookruženje predstavlja složen i dinamičan sistem koji obuhvata tumorske ćelije, ali i različite tipove nemalighnih ćelija, zatim vanćelijski matriks i signalne molekule koji zajedno utiču na razvoj i progresiju tumora (Arneth, 2020). Nemaligne ćelije u tumorskom mikrookruženju obuhvataju stromalne ćelije (poput fibroblasta, adipocita i drugih potpornih ćelija), imune ćelije (uključujući

granulocite, limfocite i makrofage), kao i endotelne ćelije koje učestvuju u formiranju krvnih sudova (Anderson i Simon, 2020; Arneth, 2020). Pored ovih tipova ćelija, značajnu ulogu imaju i specifične populacije ćelija kao što su fibroblasti povezani sa karcinomom (engl. *cancer-associated fibroblasts*) i tumorske matične ćelije, koje imaju važnu ulogu u razvoju tumora, invazivnosti i rezistenciji na terapiju (Anderson i Simon, 2020; Arneth, 2020). Komunikacija između tumorskih i okolnih ćelija odvija se putem različitih signalnih molekula, ali i putem ekstracelularnih vezikula koje prenose proteine, nukleinske kiseline i druge bioaktivne komponente (Broekman i sar., 2018). Interakcije između tumorskih i nemalignih ćelija, kao i njihova međusobna komunikacija, dovode do formiranja mikrookruženja koje aktivno podržava proliferaciju, angiogenezu, invaziju i metastaziranje (Anderson i Simon, 2020; Arandhara i sar., 2025).

Vanćelijski matriks predstavlja ključnu strukturnu i funkcionalnu komponentu tumorskog mikrookruženja, a sastavljen je od kolagena, fibronektina, laminina i drugih makromolekula (Anderson i Simon, 2020; Arneth, 2020). Pored mehaničke potpore, vanćelijski matriks aktivno učestvuje i u regulaciji adhezije, migracije i komunikacije ćelija (Arneth, 2020). Ćelije se za vanćelijski matriks vezuju putem transmembranskih proteina, među kojima su najvažniji integrini, koji omogućavaju prenos signala između ćelija i njihovog okruženja. U čvrstim tumorima vanćelijski matriks često čini značajan deo tumorske mase (do 60 %) i karakteriše se povećanim taloženjem kolagena i infiltracijom fibroblasta (Anderson i Simon, 2020). Tokom progresije tumora dolazi do njegovog intenzivnog remodelovanja, pri čemu značajnu ulogu imaju fibroblasti povezani sa karcinomom kao primarni izvor komponenti matriksa, kao i enzimi poput matriksnih metaloproteinaza (engl. *matrix metalloproteinase*, MMP) koje omogućavaju njegovu razgradnju i olakšavaju migraciju tumorskih ćelija (Anderson i Simon, 2020). Promene u sastavu i organizaciji matriksa dovode i do promena njegovih mehaničkih svojstava, uključujući povećanu krutost, što utiče na ponašanje ćelija i može doprineti smanjenoj efikasnosti terapija (Arneth, 2020).

Gradijent kiseonika predstavlja važan aspekt tumorskog mikrookruženja. Usled brzog i nekontrolisanog rasta, tumori često prerastu svoju vaskularnu mrežu i rastu brže nego što novi krvni sudovi mogu da se formiraju, što dovodi do pojave hipoksičnih zona unutar tumorskog tkiva (Bregenzler i sar., 2019). Kao posledica, razvija se heterogena prostorna organizacija tumora koju karakterišu proliferativni spoljašnji sloj, mirujuća, hipoksična srednja zona i nekrotično jezgro (Wu i sar., 2021) (slika 1.1).



Slika 1.1. Šematski prikaz prostorne organizacije tumorskog tkiva i ključnih komponenti tumorskog mikrookruženja (prilagođeno iz Wu i sar., 2021)

S obzirom na to da je prenos kiseonika difuzijom ograničen na približno 100–200 μm , ćelije u unutrašnjim delovima tumora često su izložene izrazito niskim koncentracijama kiseonika, koje u mnogim čvrstim tumorima mogu biti manje od 2 % (Ziółkowska-Suchanek, 2021). Ovakvi uslovi dovode do formiranja nekrotičnih zona, ali i podstiču adaptivne mehanizme koji omogućavaju

opstanak tumorskih ćelija, uključujući povećanu agresivnost i razvoj rezistencije na terapiju (*Balkwill i sar., 2012; Ziolkowska-Suchanek, 2021*).

Kao odgovor na hipoksične uslove, tumorske ćelije indukuju angiogenezu, što dovodi do formiranja nove vaskularne mreže. Međutim, novonastala vaskularna mreža se strukturno i funkcionalno značajno razlikuje od normalne. Krvni sudovi u tumoru su nepravilno organizovani, sa neujednačenim prečnikom, abnormalnim grananjem i povećanom permeabilnošću. Kao posledica, dolazi do curenja plazme i proteina u okolno tkivo, povećanja intersticijalnog pritiska i poremećaja protoka krvi, što otežava distribuciju imunih ćelija i doprinosi širenju tumorskih ćelija. Istovremeno, nepravilan protok krvi dovodi do regiona sa smanjenim dotokom kiseonika i nutrijenata, što rezultira ishemijskom i nekrotičnim zonama unutar tumora. Ovakvi uslovi dodatno podstiču razvoj hipoksičnog mikrokruženja i aktivaciju angiogeneze, čime se uspostavlja začarani krug. Ovakva vaskulatura značajno utiče na progresiju tumora, njegovu invazivnost i smanjenu efikasnost terapije usled otežanog dopremanja lekova (*Ahir i sar., 2020*).

U sledećem poglavlju dat je kratak pregled tri tipa malignih tumora: osteosarkoma, glioma i karcinoma pluća, uključujući njihove opšte i biološke karakteristike, sastav i strukturu tkiva u kome nastaju, tumorsko mikrokruženje, kao i pravce u lečenju.

1.1.3. Osteosarkom

1.1.3.1. Epidemiologija i opšte karakteristike osteosarkoma

Osteosarkom je najčešći primarni maligni tumor kostiju koji pretežno pogađa decu i adolescente, ali se u značajnoj meri javlja i kod starije populacije (*Mirabello i sar., 2009; Ottaviani i sar., 2009*). Godišnje od osteosarkoma oboli 3–4 pacijenta na milion stanovnika, zbog čega se smatra retkom bolešću (*Smeland i sar., 2019*). Ukupna petogodišnja stopa preživljavanja kod pacijenata sa osteosarkomom iznosi 68% (*Hegy i sar., 2011*). Međutim, usled odsustva specifičnih simptoma u ranim fazama bolesti, kod čak četvrtine obolelih u trenutku postavljanja dijagnoze već su prisutne metastaze, najčešće na plućima. U ovoj grupi pacijenata petogodišnja stopa preživljavanja iznosi svega 17% (*Hegy i sar., 2011; Eaton i sar., 2020*).

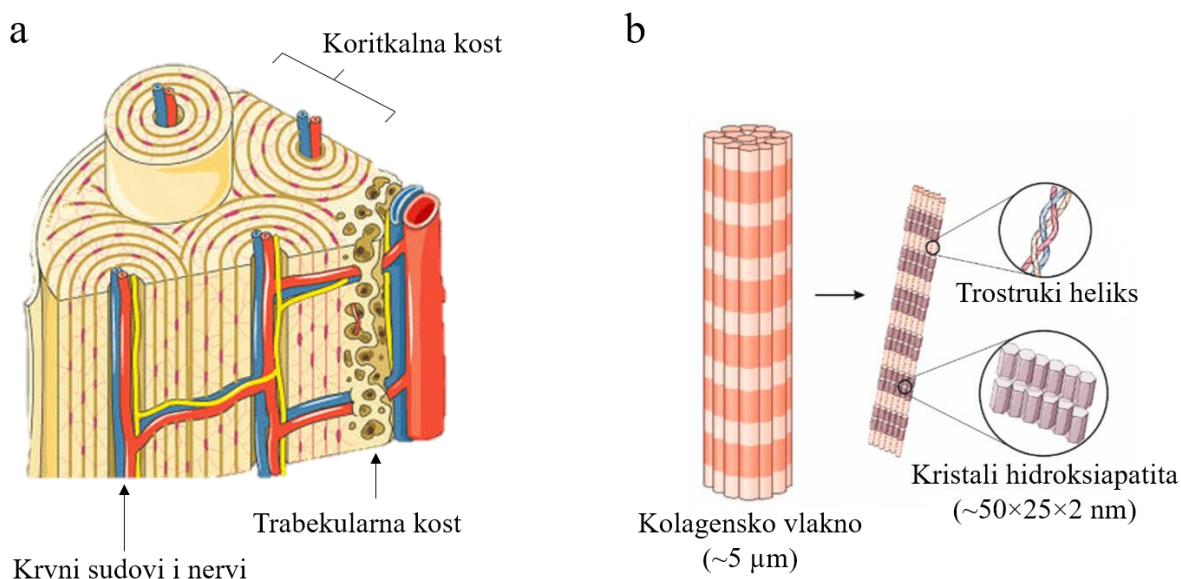
Osteosarkom se najčešće javlja u metafizama dugih kostiju ekstremiteta (distalni femur, proksimalna tibija i humerus), gde je prisutna intenzivna proliferacija tokom rasta (*De Luca i sar., 2018*). S obzirom na to, neophodno je razmotriti osnovne karakteristike koštanog tkiva, uključujući njegovu strukturu i organizaciju, kako bi se bolje razumeli uslovi koji doprinose razvoju osteosarkoma.

1.1.3.2. Sastav i struktura koštanog tkiva

Koštano tkivo se sastoji od vanćelijskog matriksa i ćelija. Vanćelijski matriks predstavlja visoko organizovanu strukturu koju čine organska komponenta (30–40 %), pretežno kolagen tipa I koji obezbeđuje elastičnost i otpornost na savijanje, i neorganska komponenta (50–60 %), uglavnom nanokristali hidroksiapatita koji daju pritisnu čvrstoću, dok ostatak čini voda (10–20 %) (*Buckwalter i Cooper, 1987; Mirzaali i sar., 2016*). Koštane ćelije, uključujući osteoblaste odgovorne za sintezu i mineralizaciju koštanog matriksa, osteocyte koji održavaju koštano tkivo i učestvuju u mehanotransdukciji, kao i osteoklaste odgovorne za resorpciju kosti, koordinisano učestvuju u stvaranju, održavanju i remodelovanju koštanog matriksa.

Prema strukturi, u skeletu odraslog čoveka razlikuju se kortikalna i trabekularna kost, koje imaju različitu strukturu i raspodelu matriksa, ali gotovo identičan hemijski sastav (*Hadjidakis i Androulakis, 2006*). Kortikalna kost je kompaktna i organizovana u lamelarnu strukturu, u čijem se središtu nalaze krvni sudovi i nervi, dok je trabekularna kost izgrađena od mreže trabekula (čvrstih koštanih struktura) koje se međusobno prepliću i povezuju, formirajući poroznu, sponozastu strukturu (*Lopes i sar., 2018*) (slika 1.2a).

Na nivou nanometarskih dimenzija, kolagen tipa I organizovan je u trostruki heliks i predstavlja matricu za taloženje i rast nanokristala hidroksiapatita, koji su orijentisani duž kolagenskih vlakana (Ressler i sar., 2021) (slika 1.2b).



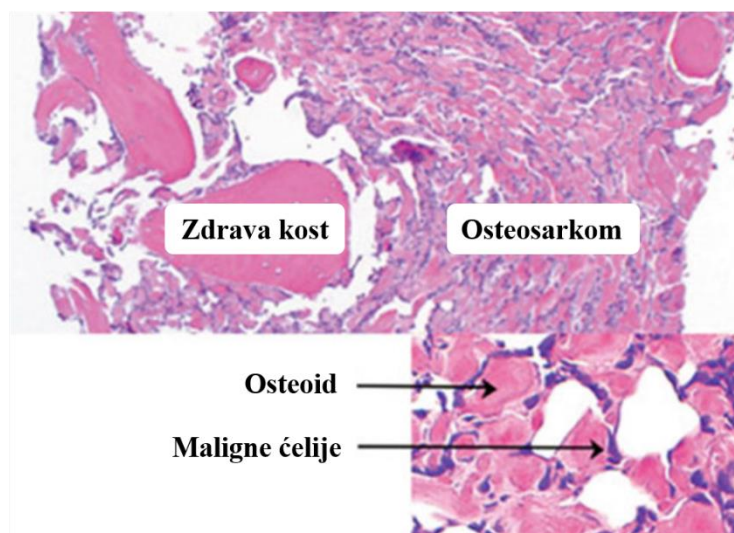
Slika 1.2. Šematski prikaz strukture i organizacije kosti na a) makro- i b) nanonivou (prilagođeno iz Lopes i sar., 2018 i Ressler i sar., 2021)

S obzirom na dinamičnu prirodu koštanog tkiva, koju karakterišu intenzivni procesi rasta i remodelovanja, ćelije koje se brzo dele podložne su malignoj transformaciji i razvoju osteosarkoma (Beird i sar., 2022).

1.1.3.3. Biološke karakteristike i mikrookruženje osteosarkoma

Smatra se da osteosarkom nastaje malignom transformacijom ćelija mezenhimske linije, najverovatnije u populaciji proliferišućih, delimično diferenciranih prekursora osteoblastne linije. Njegov razvoj je rezultat složenog delovanja više faktora i započinje u kontekstu ubrzane ćelijske proliferacije tokom rasta kosti, gde intenzivna deljenja ćelija povećavaju rizik od progresivnog nagomilavanja genetskih mutacija. Ove promene mogu da dovedu do aktivacije onkogeni i inaktivacije tumor-supresorskih gena, što pokreće malignu transformaciju. Dalji rast i napredovanje tumora omogućeni su pogodnim tumorskim mikrookruženjem (Beird i sar., 2022).

Histološki, osteosarkom se karakteriše prisustvom malignog osteoida koji stvaraju maligne ćelije (slika 1.3). Osteoid predstavlja nezreli, slabo mineralizovani matriks mrežaste strukture, koji se nalazi u blizini malignih ćelija. Maligne ćelije su tipično pleomorfne, sa hiperkromatičnim jedrima i izraženom mitotičkom aktivnošću (Motassime i sar., 2025).



Slika 1.3. Histološki prikaz zdravog koštanog tkiva (levo) koje je infiltrirano ćelijama osteosarkoma (desno). Na uvećanom prikazu mogu se uočiti osteoid i maligne ćelije (prilagođeno iz *Kim i Khanna, 2014*)

Količina osteoida i koštanog matriksa može značajno varirati kako između različitih tumora, tako i unutar pojedinačnog tumora. U zavisnosti od dominantnog tipa matriksa, razlikuju se osteoblastni, hondroblastni i fibroblastni podtipovi osteosarkoma, pri čemu se u većini tumora istovremeno mogu uočiti elementi svih podtipova (*Ritter i Bielack., 2010*).

Na nivou ćelijske regulacije, neki od transkripcionih faktora koji imaju važnu ulogu u usmeravanju ćelija ka osteoblastnoj liniji, kao što su *SOX9*, *RUNX2* i *Osterix*, kod osteosarkoma pokazuju povećanu ekspresiju (*Beird i sar., 2022*).

Tumorsko mikrookruženje ima ključnu ulogu u razvoju i progresiji osteosarkoma, pri čemu interakcija između tumorskih ćelija i njihovog okruženja predstavlja osnovu za rast tumora u koštanom tkivu. U zdravom koštanom tkivu postoji dinamička ravnoteža između ćelijskih i vanćelijskih komponenti, koja obezbeđuje održavanje homeostaze kosti. Međutim, u prisustvu osteosarkoma dolazi do narušavanja ove ravnoteže. U početnim fazama bolesti, proliferacija ćelija osteosarkoma dovodi do poremećaja u odnosu između osteoblasta i osteoklasta, pojačane aktivnosti osteoklasta i povećane resorpcije kosti, čime se oslobađaju različiti faktori rasta iz koštanog matriksa koji dodatno stimulišu proliferaciju malignih ćelija (*Beird i sar., 2022*). Na taj način se uspostavlja začarani krug između tumora i njegovog mikrookruženja, koji omogućava dalji rast i progresiju osteosarkoma.

1.1.3.4. Terapija osteosarkoma

Trenutno, lečenje osteosarkoma uključuje hemioterapiju standardnim antitumorskim lekovima kao što su doksorubicin, metotreksat i cisplatin pre i nakon hirurške resekcije tumora (*Meyers i sar., 2005; Harrison i sar., 2017; Eaton i sar., 2020*). Iako je konvencionalna hemioterapija značajno doprinela poboljšanju dugoročnog preživljavanja pacijenata sa osteosarkomom, u poslednjih četrdeset godina nije došlo do značajnog unapređenja terapijskih opcija za ovo oboljenje (*Mohseny i sar., 2012; Luetke i sar., 2014; Munoz-Garcia i sar., 2021*).

1.1.4. Gliom

1.1.4.1. Epidemiologija i opšte karakteristike glioma

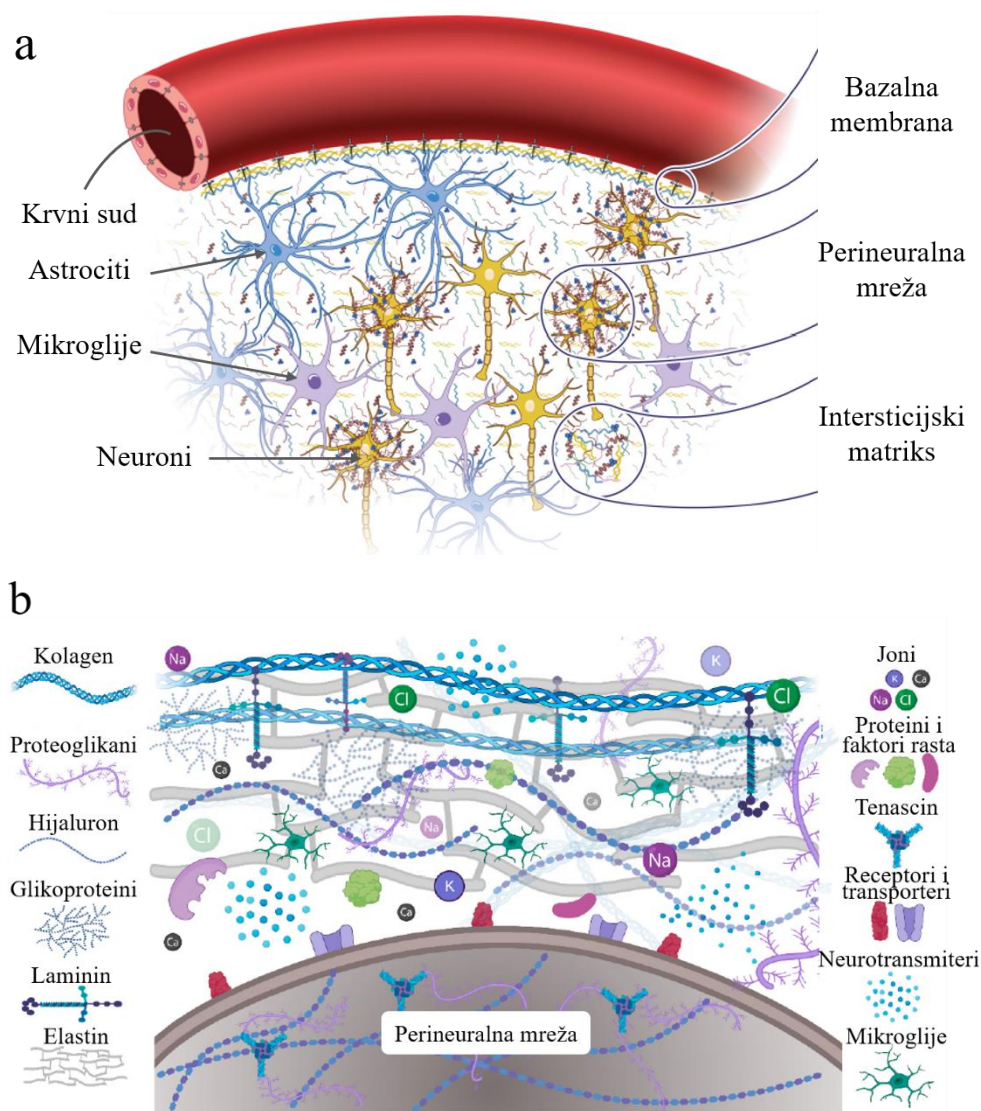
Gliomi predstavljaju najčešće primarne maligne tumore mozga, sa incidencijom od 4–6 slučajeva na 100 000 stanovnika (*Ostrom i sar., 2014*). Mogu se javiti u svim uzrastima, ali su češći kod odraslih,

naročito između 40 i 65 godina starosti (*Schneider i sar., 2010*). Najzastupljeniji i najinvazivniji tip ovog tumora je glioblastom, koji se povezuje sa izuzetno agresivnim tokom bolesti i ukupnim preživljavanjem kraćim od 3 meseca ukoliko se ne leči (*Lin i sar., 2013*). Glioblastom je izrazito rekurentan tumor sa gotovo 100 % stopom povratka, što je posledica njegove infiltrativne prirode koja omogućava širenje kroz zdravo moždano tkivo, kao i njegove izražene rezistencije na radio- i hemioterapiju (*Sminia i Mayer, 2012*).

1.1.4.2. Sastav i struktura nervnog tkiva

Nervno tkivo predstavlja morfološku osnovu nervnog sistema i izgrađeno je od neurona i glijalnih ćelija (astrocita, oligodendrocita i mikroglijskih ćelija). Neuroni prenose informacije putem električnih impulsa i sastoje se od tela ćelije i nastavaka (dendrita i aksona), dok glijalne ćelije obezbeđuju strukturnu i metaboličku podršku neuronima, učestvuju u zaštiti nervnog tkiva i formiranju mijelinske ovojnice. U mozgu se nervno tkivo organizuje u sivu i belu masu, koje se razlikuju po strukturi i funkciji. Siva masa pretežno sadrži tela neurona, dendrite, nemijelizovane aksone i nervne sinapse, dok je bela masa izgrađena uglavnom od mijelizovanih aksona koji formiraju nervne puteve i omogućavaju povezivanje različitih delova mozga (*Wen i Chklovskii, 2005*). U obe komponente prisutne su i glijalne ćelije, kao i bogata mreža krvnih sudova.

Vanćelijski matriks čini oko 20 % ukupne zapremine mozga odraslog čoveka (*Soles i sar., 2023*). Sintetišu ga neuroni i glijalne ćelije, a sastoji se od tri glavne komponente: bazalne membrane koja okružuje krvne sudove i učestvuje u održavanju krvno-moždane barijere, perineuronalne mreže koja obavlja neurone i omogućava formiranje bliskih sinaptičkih veza, i intersticijskog matriksa koji ispunjava prostor između ćelija i omogućava njihovu međusobnu komunikaciju (slika 1.4a) (*Kim i sar., 2018*).



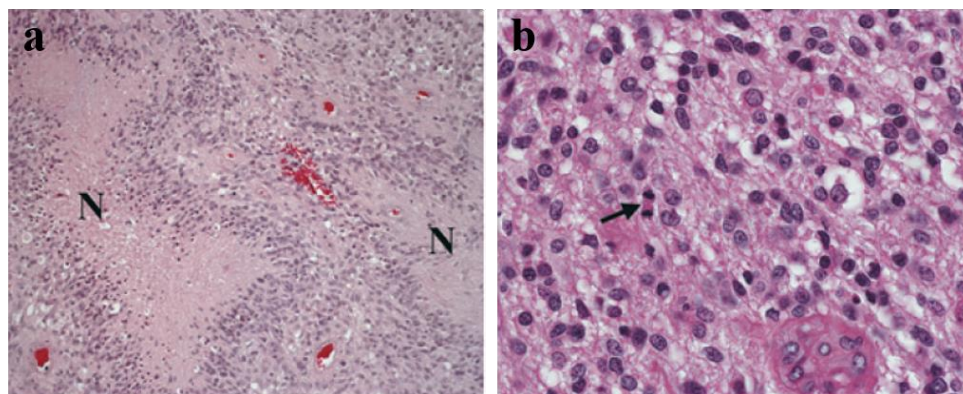
Slika 1.4. Šematski prikaz moždanog tkiva: a) organizacija ćelija i vanćelijskog matriksa; b) sastav vanćelijskog matriksa (prilagođeno iz Kim i sar., 2018 i Soles i sar., 2023)

Na molekularnom nivou, vanćelijski matriks mozga sastoji se od proteina i ugljenih hidrata. Strukturni proteini, kao što su kolagen, laminin i elastin, formiraju organizovanu mrežu koja obezbeđuje mehaničku potporu, dok amorfnu fazu čine hijaluron, proteoglikani, glikoproteini, tenascini i vezujući proteini (slika 1.4b). Pored toga, matriks sadrži i rastvorljive komponente, uključujući faktore rasta, neurotransmitere, jone i druge signalne molekule, koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ponašanja (Soles i sar., 2023).

1.1.4.3. Biološke karakteristike i mikrookruženje glioma

Smatra se da gliomi potiču od glijalnih ćelija, pri čemu se kao moguće ćelije porekla navode astrociti, nervne matične ćelije i prekusori oligodendrocita (Jiang i Uhrbom, 2012). Gliome karakteriše izražena heterogenost između različitih tumora iste dijagnoze, ali i unutar samog tumora, što je posledica različitih kombinacija genetskih i epigenetskih promena koje nastaju tokom razvoja tumora, kao i potencijalnog porekla iz različitih ćelijskih tipova (Jiang i Uhrbom, 2012). Prema SZO klasifikaciji iz 2021. godine, tumori centralnog nervnog sistema se kategorišu integrisanim pristupom koji kombinuje histologiju i molekularnu dijagnostiku. Gliomi se klasifikuju u pet osnovnih grupa: difuzne gliome kod odraslih, pedijatrijske difuzne gliome niskog stepena, pedijatrijske difuzne gliome visokog stepena, cirkumskriptne astrocitne gliome i ependimalne tumore. Unutar grupe difuznih glioma kod odraslih, klasifikacija se primarno oslanja na status mutacija unutar gena za

izocitrat dehidrogenazu (IDH), čime se definišu tri grupe: IDH-mutirani astrocitom, IDH-mutirani i 1p/19q-kodeletirani (ko-delecija 1p i 19q hromozomskih regiona) oligodendrogliom i glioblastom IDH-wt (*Louis i sar., 2021*). Osnovne histološke karakteristike glioma su: nuklearna atipija (varijacije u obliku, veličini i boji jedra), mitotska aktivnost, endotelna hiperplazija (zadebljanje sloja endotelnih ćelija) i nekroza. Glioblastom pokazuje tri do četiri navedene morfološke promene (slika 1.5) i odlikuje se izraženim infiltrativnim rastom u moždanom tkivu, pri čemu retko metastazira van centralnog nervnog sistema (*Nakada i sar., 2007*).



Slika 1.5. Histološki prikaz centralnog dela glioblastoma: a) uočavaju se nekrotične zone (N) okružene tumorskim ćelijama (originalno uvećanje $\times 100$); b) prisutne su pleomorfne ćelije sa nuklearnom atipijom, uz uočenu mitotsku aktivnost (strelica) (originalno uvećanje $\times 400$) (prilagođeno iz *Nakada i sar., 2007*)

Migracija ćelija glioma ne odvija se na nasumičan način, već duž specifičnih puteva u mozgu, kao što su nervni putevi u beloj masi, mijelinizovani aksoni, aksonski i glijalni nastavci u sivoj masi, kao i duž krvnih sudova (*Dundar i sar., 2020*). Ovi tipični putevi invazije ukazuju na značaj interakcija između migrirajućih ćelija i njihovog mikrookruženja (*Nakada i sar., 2007*).

Tumorska masa se karakteriše izmenjenim sastavom vanćelijskog matriksa, sa povećanim koncentracijama fibroznih i adhezivnih proteina, kao što su kolagen, fibronektin i laminin. Kako bi olakšale invaziju, ćelije glioma aktivno remodeluju lokalni matriks sintezom određenih komponenti, uključujući fibronektin, vitronektin, kolagen, tenaskin i laminin, kao i lučenjem enzima, naročito matriksnih metaloproteinaza, posebno u regionima aktivne invazije (*Pedron i sar., 2013*). Ove promene stvaraju fizičke uslove pogodne za migraciju i širenje tumorskih ćelija, dok istovremeno mogu otežati transport lekova kroz tkivo (*Dundar i sar., 2020*).

1.1.4.4. Terapija glioma

Standardna klinička terapija glioma podrazumeva maksimalno bezbednu hiruršku resekciju tumora, praćenu radioterapijom i hemioterapijom temozolomidom (*Di Nunno i sar., 2022*). Ovaj terapijski pristup, uveden 2005. godine, ostao je do danas praktično nepromenjen, iako je od tada sprovedeno više hiljada kliničkih studija (*Soubéran i Tchoghandjian, 2020*). Kod glioblastoma, izražena infiltracija tumora u okolno moždano tkivo najčešće onemogućava njegovo potpuno uklanjanje hirurškim putem (*Grobbe i sar., 2002*).

U slučaju rekurentnog glioma, terapijske opcije su ograničene i obuhvataju ponovnu hiruršku resekciju, dodatne cikluse hemioterapije i ponovljenu radioterapiju. Međutim, uprkos ovako agresivnom pristupu, prosečno ukupno preživljavanje iznosi samo 14,6 meseci (*Lin i sar., 2013*), što ukazuje na potrebu za razvojem efikasnijih terapija.

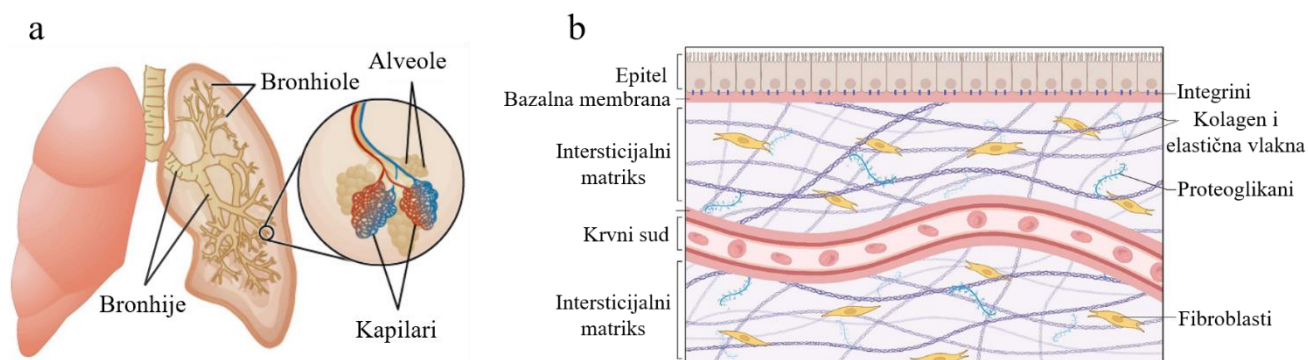
1.1.5. Karcinom pluća

1.1.5.1. Epidemiologija i opšte karakteristike karcinoma pluća

Karcinom pluća predstavlja vodeći uzrok smrti od malignih bolesti u svetu. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (*World Health Organization, 2024*), tokom 2022. godine procenjeni broj novih slučajeva iznosio je 2,5 miliona, što je činilo 12,4% ukupno dijagnostikovanih karcinoma. Karcinom pluća se retko javlja pre 40. godine života, nakon čega njegova učestalost postepeno raste do oko 80. godine, a zatim opada (*Pislaru i sar., 2024*). Glavni uzrok karcinoma pluća je pušenje, koje je odgovorno za približno 85 % svih slučajeva. Prema histologiji malignih ćelija, karcinom pluća se može podeliti u dve grupe: nesitnoćelijski i sitnoćelijski (*Li i sar., 2023*). Nesitnoćelijski karcinom pluća je češći i čini oko 85 % slučajeva karcinoma pluća, sa petogodišnjom stopom preživljavanja od svega 15 %. Sitnoćelijski karcinom pluća karakterišu brz rast i rano metastaziranje, pri čemu procenjena stopa petogodišnjeg preživljavanja iznosi svega 6,2 % (*Vella i sar., 2024*).

1.1.5.2. Sastav i struktura pluća

Pluća čine intrapulmonalni provodni disajni putevi i parenhim. Intrapulmonalni disajni putevi (bronhije i bronhiole) čine približno 6–10 % zapremine pluća, dok parenhim, koji predstavlja deo pluća zadužen za razmenu gasova i obuhvata alveolarne kesice i alveole, čini oko 85 % zapremine (slika 1.6a). Između ova dva dela nalazi se prelazna zona koja ih funkcionalno povezuje. Pluća su obavijena slojem vezivnog tkiva i mezotelnih ćelija koji čini visceralnu pleuru. Preostali deo (oko 9-10 %) čine intrapulmonalno nervno i vaskularno tkivo, uključujući plućne arterije, vene i bronhijalne krvne sudove (*Plopper, 1996*).



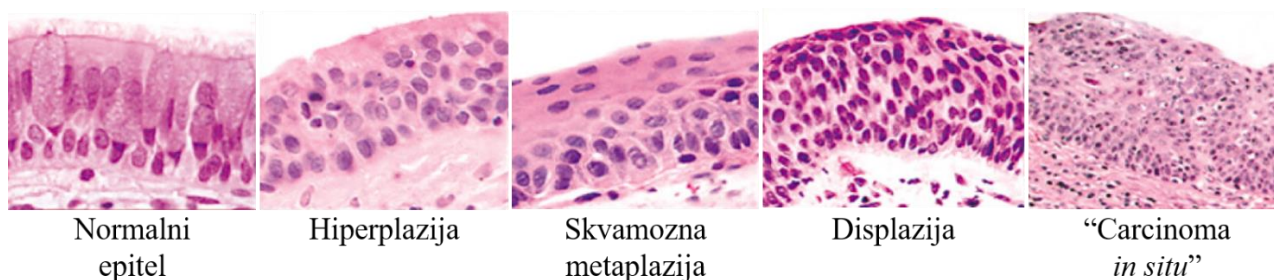
Slika 1.6. Šematski prikaz plućnog tkiva na a) makro- i b) mikronivou (prilagođeno iz *Al-Husinat i sar., 2024* i <https://www.careerpower.in/school/biology/lungs>)

Vanćelijski matriks pluća učestvuje u formiranju i održavanju tkivne arhitekture, pri čemu obezbeđuje mehaničku stabilnost i elastičnu retrakciju, koji su neophodni za fiziološku funkciju pluća. Organizovan je u dva glavna strukturna tipa: bazalnu membranu i intersticijalni matriks (slika 1.6b). Bazalna membrana predstavlja tanak sloj vanćelijskog matriksa koji oblaže bazalnu stranu epitela i endotela, kao i pojedine tipove ćelija (mišićne, masne i periferne nervne ćelije), dok intersticijalni matriks formira rastresitu fibrilarnu mrežu koja povezuje ćelije i održava trodimenzionalnu strukturu tkiva. Kolagen je najzastupljeniji protein u plućnom tkivu. Fibrilarni tipovi kolagena (I, II, III, V i XI), koji poseduju veliku zateznu čvrstoću i malu elastičnost, doprinose osnovnoj arhitekturi pluća, dok elastična vlakna, građena pretežno od elastina, omogućavaju potrebnu elastičnu retrakciju pluća. Pored toga, proteoglikani čine važnu komponentu vanćelijskog matriksa (*Burgstaller i sar., 2017*).

1.1.5.3. Biološke karakteristike i mikrookruženje plućnog karcinoma

Nesitoćelijski karcinom pluća obuhvata tri histološka podtipa: adenokarcinom, planocelularni (skvamozni) i krupnoćelijski karcinom pluća. Adenokarcinom pluća nastaje iz epitelnih ćelija malih bronhija, bronhiola i alveola i najčešće je periferno lokalizovan, dok planocelularni i krupnoćelijski karcinomi pluća uglavnom nastaju iz velikih bronhija i centralno su lokalizovani (*Altorki i sar., 2019*).

Karcinom pluća se razvija postepeno kroz niz molekularnih i morfoloških promena koje započinju u histološki normalnom epitelu. U respiratornom epitelu, posebno kod pušača, mogu se naći brojne genetske abnormalnosti čak i pre pojave vidljivih histoloških promena (*Minna i sar., 2002*). U zavisnosti od tipa tumora, u literaturi su opisani različiti histološki putevi razvoja nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Kod planocelularnog karcinoma, početne promene uključuju hiperplaziju (povećanje broja ćelija uz očuvanu osnovnu strukturu epitela) i skvamoznu metaplaziju (zamenu normalnog respiratornog epitela pločastim epitelom), nakon čega sledi displazija (poremećaj u sazrevanju i organizaciji ćelija praćen povećanom atipijom i gubitkom normalne arhitekture), dok je najteži preinvazivni stadijum “carcinoma *in situ*“, u kojem su prisutne izražene citološke abnormalnosti, ali bez invazije kroz bazalnu membranu (slika 1.7).



Slika 1.7. Histološki prikaz progresivnih morfoloških promena tokom razvoja planocelularnog karcinoma pluća (prilagođeno iz *Minna i sar., 2002*)

Sa druge strane, kod adenokarcinoma dolazi do promena koje uključuju proliferaciju blago atipičnih epitelnih ćelija u očuvanim alveolarnim strukturama bez invazije, nakon čega dolazi do razvoja invazivnog tumora usled prodora malignih ćelija u okolno tkivo (*Wistuba i Gazdar, 2006*).

Međutim, razvoj karcinoma pluća ne zavisi isključivo od promena u tumorskim ćelijama, već i od njihove interakcije sa okolnim mikrookruženjem.

U nesitnoćelijskom karcinomu pluća često su prisutni fibroblasti povezani sa karcinomom, koji učestvuju u regulaciji proliferacije tumorskih ćelija, angiogeneze, invazije, metastaziranja i rezistencije na terapiju (*Altorki i sar., 2019*). Tokom progresije bolesti dolazi do značajnih promena u sastavu i mehaničkim karakteristikama vanćelijskog matriksa, uključujući povećano taloženje i umrežavanje kolagena, kao i povećane proizvodnje proteina poput fibronektina, tenascina C i hijaluronana, što dovodi do povećanja čvrstoće tkiva i formiranja mehaničkih gradijenata između obolelog i zdravog tkiva, koji utiču na migraciju ćelija (*Burgstaller i sar., 2017*).

Hipoksija predstavlja značajnu karakteristiku mikrookruženja karcinoma pluća. Kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća, koncentracija kiseonika unutar tumora iznosi oko 2 %, u poređenju sa 5,6 % u zdravom plućnom tkivu (*Vella i sar., 2024*). Ovakvi uslovi utiču na progresiju, metastaziranje i metabolizam tumora izazivajući proteomske i genomske promene unutar ćelija, koje mogu pokrenuti zaustavljanje ćelijskog ciklusa, diferencijaciju, nekrozu i apoptozu, ali i podstaći rast tumora, invaziju, metastaziranje, angiogenezu, anaerobni metabolizam i druge procese koji pomažu malignim ćelijama da prežive u okruženju sa malim sadržajem kiseonika (*Ziółkowska-Suchanek, 2021*). Sposobnost tumorskih ćelija da se prilagode hipoksičnim uslovima povezana je sa povećanom agresivnošću i razvojem rezistencije na hemioterapiju i ciljanu terapiju (terapija koja selektivno deluje na specifične molekule u tumorskim ćelijama) (*Vella i sar., 2024*).

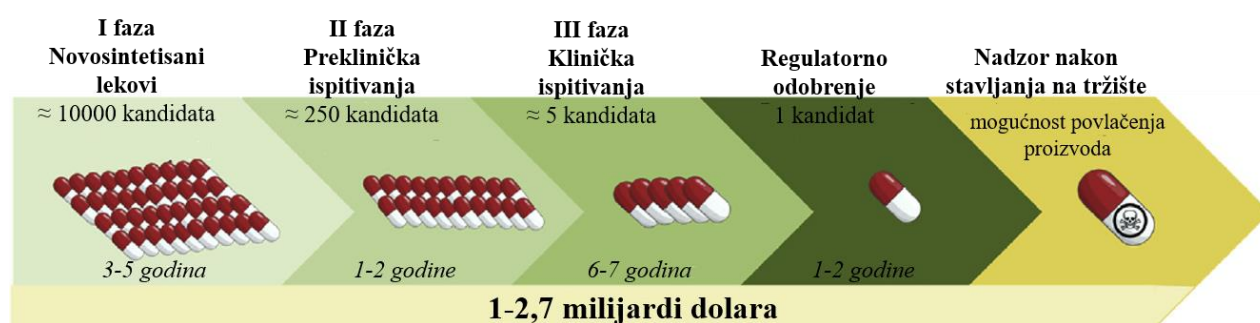
1.1.5.4. Terapija karcinoma pluća

Terapijske opcije za lečenje karcinoma pluća obuhvataju hirurško lečenje, radioterapiju, hemioterapiju, ciljanu terapiju i imunoterapiju (*Vella i sar., 2024*). Lečenje nesitnoćelijskog karcinoma pluća u ranim stadijumima podrazumeva hiruršku resekciju tumora, često uz dopunsku terapiju. Međutim, u naprednijim stadijumima bolesti, terapijski pristup se preusmerava ka hemioterapiji ili radioterapiji, dok se kod neoperabilnih pacijenata najčešće primenjuje kombinacija

hemioterapije sa ciljanim ili imunoterapijskim lekovima (Wieleba i sar., 2022; Li i sar., 2023). Ipak, dalji napredak u primeni hemioterapije i radioterapije ograničen je njihovim izraženim neželjenim efektima (Vella i sar., 2024). Pored toga, gotovo svi tradicionalni hemioterapijski lekovi imaju slična ograničenja, poput male specifičnosti, loše bioraspoloživosti i razvoja rezistencije, što značajno smanjuje njihovu efikasnost (Li i sar., 2023). Uprkos napretku u terapijskim pristupima, stopa preživljavanja pacijenata sa karcinomom pluća i dalje je veoma mala, a dodatna teškoća je visoki procenat neuspeha novih lekova u kliničkim fazama ispitivanja, što naglašava hitnu potrebu za bezbednijim i efikasnijim terapijama.

1.2. Antitumorski lekovi

Razvoj novih antitumorskih lekova predstavlja spor i skup proces. Procene troškova celokupnog razvoja jednog leka, od sinteze u laboratoriji do izlaska na tržište, kreću se u opsegu od 1 do 2,7 milijardi dolara, dok prosečno trajanje ovog procesa iznosi 11–16 godina (Brancato i sar., 2020). Ovi troškovi obuhvataju različite faze, uključujući preklinička istraživanja, više faza kliničkih ispitivanja i usklađivanje sa regulatornim standardima (slika 1.8). Tako veliki izdaci su rezultat složenosti istraživanja tumora, koja zahtevaju značajna ulaganja i vremena i resursa. Pored toga, farmaceutske kompanije često ne uspevaju da dobiju odobrenje za lekove u fazi ispitivanja, pa oni ni ne dospevaju na tržište ili se povlače zbog toksikoloških i bezbednosnih razloga, ili usled nepredviđenih okolnosti tokom prekliničkih i kliničkih ispitivanja.



Slika 1.8. Put razvoja novog leka od sinteze u laboratoriji do izlaska na tržište (prilagođeno iz Brancato i sar., 2020)

U okviru prekliničkog razvoja antitumorskih lekova, efikasnost se dominantno procenjuje korišćenjem 2D ćelijskih kultura i životinjskih modela, koji ne reprodukuju u potpunosti kompleksnost tumorskog mikrookruženja u organizmu čoveka. Ovo ograničenje doprinosi razlici u odgovoru na terapiju između prekliničkih i kliničkih ispitivanja.

1.2.1. Multirezistencija na antitumorske lekove

Pored ograničenja prekliničkih modela u predikciji terapijskog odgovora, klinička efikasnost antitumorskih lekova dodatno je ograničena pojavom različitih mehanizama rezistencije u malignim ćelijama. Jedan od najznačajnijih oblika rezistencije je multirezistencija na lekove (engl. *multidrug resistance*, MDR), koja predstavlja pojavu pri kojoj maligne ćelije postaju neosetljive na više različitih lekova koji se razlikuju po strukturi i mehanizmu delovanja, tokom ili ubrzo nakon početka terapije. Poznato je više mehanizama koji mogu doprineti razvoju multirezistencije, a jedan od njih je prekomerna ekspresija membranskih proteina ABC transportera (ATP-vezujući kasetni transporteri, engl. *ATP binding cassette transporters*), koji posreduju u izbacivanju lekova iz ćelija (Fan i sar., 2022).

ABC transporteri koriste hidrolizu adenozin-trifosfata (ATP) kako bi transportovali lekove kroz ćelijsku membranu u spoljašnju sredinu. Važno je napomenuti da je prekomerna ekspresija ovih transportera najčešći mehanizam koji dovodi do hemorezistencije, povećavajući izbacivanje različitih

citostatika iz ćelija. Među svim ABC transporterima, ABCB1 (poznat i kao MDR1), ABCC1 i ABCG2 su najviše proučavani i povezani su sa multirezistencijom u ćelijama malignih tumora (*Liu, 2009*). Ćelijske linije humanog karcinoma jajnika u kojima je izazvana multirezistencija na lekove imale su povećanu ekspresiju *MDR1* gena (*Fojo i sar., 1987*). U zavisnosti od uslova gajenja, može se očekivati različit profil genske ekspresije s obzirom na to da ćelijsko okruženje utiče na regulaciju gena (*Han i sar., 2008*).

Kao mera efikasnosti antitumorskih lekova koristi se polovina maksimalne inhibitorne koncentracije (IC_{50}), odnosno koncentracija leka potrebna da se vijabilnost ćelija smanji za 50 %. Što je IC_{50} vrednost manja, to je veća osetljivost ćelija na dati lek, odnosno potrebna je manja koncentracija leka kako bi se postigao isti inhibicioni efekat.

1.2.2. Mehanizmi delovanja odabranih antitumorskih lekova

U ovom poglavlju dat je kratak pregled mehanizama delovanja odabranih standardnih hemioterapeutika (cisplatin, etopozid, vinorelbin i doksorubicin) korišćenih u ovom radu.

Cisplatin je hemioterapijski lek na bazi platine koji izaziva oštećenja DNK formiranjem ukrštenih veza između purinskih baza preko atoma platine, čime ometa replikaciju i transkripciju u malignim ćelijama, što dovodi do apoptoze. Lekovi na bazi platine spadaju među najčešće korišćene hemioterapeutike za lečenje različitih karcinoma i sarkoma, bilo kao prva linija terapije ili kao alternativni tretman nakon razvoja rezistencije na inicijalni hemioterapijski koktel. Njihova primena je značajno ograničena zbog velike toksičnosti za različite organe, uključujući bubrege i gastrointestinalni trakt. Osim toga, maligne ćelije često tokom terapije razviju rezistenciju na platinske lekove, što značajno otežava efikasnost lečenja (*Romani, 2022*). Ipak, sinergistička primena cisplatina sa drugim antitumorskim lekovima, kao i njegova sposobnost imunomodulatornog delovanja, opravdava nastavak kliničke primene ovog leka i njegovih derivata.

Etopozid je antitumorski lek snažnog dejstva koji spada u klasu inhibitora DNK topoizomeraza, enzima koji su zaduženi za topologiju DNK. Njegova citotoksičnost proističe iz sposobnosti da stabilizuje kovalentni kompleks između enzima topoizomeraze II i DNK, što izaziva dvolančane prekide u DNK i podstiče apoptozu kod malignih ćelija koje se brzo dele (*Montecucco i Biamonti, 2007*). Zahvaljujući svojoj sposobnosti da selektivno deluje na tumorske ćelije sa velikim indeksom proliferacije, etopozid je postao osnovni lek za lečenje karcinoma pluća, posebno u kombinovanim terapijama (*Jang i sar., 2025*). Ipak, i ovaj lek je povezan sa različitim neželjenim efektima, kao i sa razvojem rezistencije. Zbog njegove toksičnosti, etopozid se često primenjuje u kombinovanim terapijama, koje imaju cilj da povećaju efikasnost lečenja uz istovremeno smanjenje neželjenih efekata povezanih sa velikim dozama leka (*Jang i sar., 2025*).

Vinorelbin je antimitotski antitumorski lek čiji je glavni mehanizam delovanja povezan sa inhibiranjem polimerizacije tubulina i formiranja mikrotubula, što sprečava stvaranje deobnog vretena i dovodi do zaustavljanja mitoze i smrti ćelija (*Capasso, 2012*). Pretklinička istraživanja su pokazala da vinorelbin ima snažno dejstvo protiv širokog spektra malignih ćelijskih linija i da, u poređenju sa drugim alkaloidima iz iste porodice, pokazuje veću aktivnost kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća u *in vitro* i *in vivo* uslovima (*Piccirillo i sar., 2010*). Posebno se koristi u lečenju pacijenata sa naprednim stadijumom nesitnoćelijskog karcinoma pluća i često se kombinuje sa platinskim lekovima (*Piccirillo i sar., 2010*). Iako postoji više molekularnih faktora koji određuju rezistenciju na vinorelbin, jedan od najznačajnijih je povećana ekspresija i aktivacija membranskih ABC transportera (razvoj multirezistencije na lekove) (*Stuckler i sar., 2005*).

Doksorubicin spada među najsnažnije hemioterapijske lekove i koristi se za lečenje različitih tipova malignih tumora, posebno čvrstih (*Taymaz-Nikerel i sar., 2018*), i veoma je efikasan protiv osteosarkoma (*Gonçalves i sar., 2015*). Doksorubicin izaziva citotoksične efekte putem različitih mehanizama, uključujući direktno umetanje u DNK i inhibiciju topoizomeraze II, kao i stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *reactive oxygen species*) i slobodnih radikala (*Niu i sar., 2021*).

Međutim, kontinuirani tretman doksorubicinom može dovesti do razvoja rezistencije na lek i povećane citotoksičnosti, posebno kardiotoksičnosti, što su dva najčešća neželjena efekta ovog leka (Niu i sar., 2021).

Uprkos poznavanju mehanizama delovanja antitumorskih lekova, njihova efikasnost u složenim biološkim uslovima i dalje nije u potpunosti predvidiva. Ograničenja tradicionalnih pretkliničkih modela u oponašanju *in vivo* tumora ukazala su na potrebu za razvojem relevantnijih *in vitro* sistema, što predstavlja osnovu inženjerstva tumora.

1.3. Inženjerstvo tumora

1.3.1. Koncept inženjerstva tumora

Inženjerstvo tumora je relativno nova oblast koja se razvila na principima inženjerstva tkiva i usmerena je na razvoj 3D modela tumora *in vitro*. Ovi modeli imaju za cilj da oponašaju složeno mikrookruženje tumora, uključujući tumorske ćelije i ćelije strome, vanćelijski matriks i interakcije sa okolnim tkivima, kao i biofizičke i biohemijske signale, kako bi se proučavao razvoj tumora, njegova progresija i odgovor na terapije. Obezbeđivanjem relevantnijih *in vitro* modela, inženjerstvo tumora može doprineti smanjenju potrebe za testiranjem na životinjama, u skladu sa 3R principima (engl. *Replacement, Reduction, and Refinement* – zamena, smanjenje i unapređenje testiranja na životinjama) (Russell i Burch, 1959; Hartung, 2009).

Savremeni pristupi u inženjerstvu tumora uključuju kombinovanje malignih ćelija sa stromalnim ćelijama, uključujući fibroblaste, imune i endotelne ćelije, kako bi se imitirao složen sastav mikrookruženja tumora (Fong i sar., 2016). Dodatno, simulacija prirodno prisutnih gradijenata kiseonika, nutrijenata i lekova unutar modela omogućava oponašanje heterogenosti tumora. Za rekonstrukciju strukturnih i funkcionalnih karakteristika mikrookruženja tumora koriste se različiti biomaterijali, poput polimera, keramičkih i kompozitnih biomaterijala i decelularizovanog matriksa, koji služe kao 3D nosači za ćelije i omogućavaju njihovu organizaciju u prostoru. U cilju obezbeđivanja kontrolisanih uslova kulture, ovi sistemi se često gaje u biomimичnim bioreaktorima koji omogućavaju efikasan prenos hranljivih materija i kiseonika, kao i relevantne fizičke signale (Liu i Vunjak-Novaković, 2016).

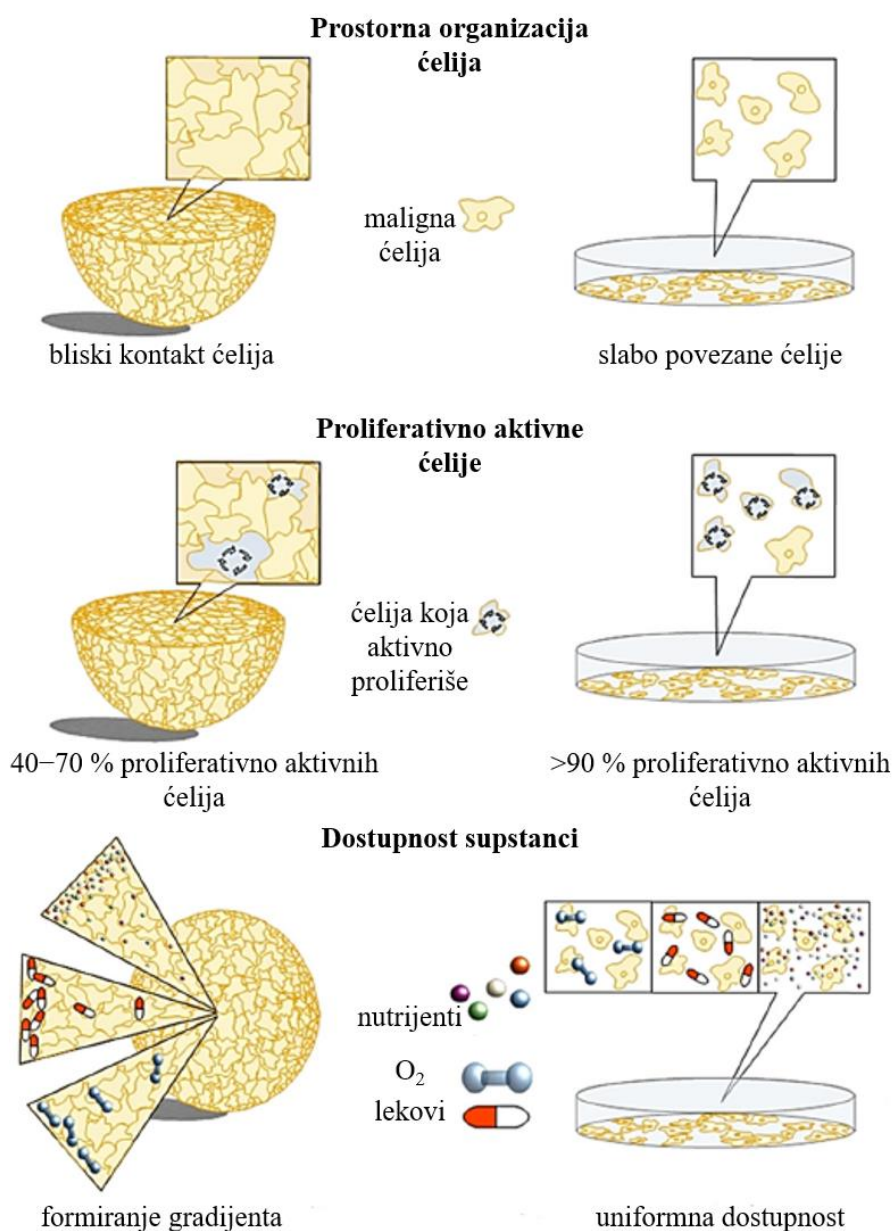
Međutim, obuhvatanje svih aspekata mikrookruženja tumora u jednom modelu još uvek je prekomplikovano uspostaviti, održati i analizirati. Zbog toga se najčešće razvijaju pojednostavljeni modeli koji se fokusiraju na odabrane ključne karakteristike tumora.

1.3.2. Značaj 3D modela u ispitivanju antitumorskih lekova

Primena relevantnih *in vitro* modela tumora omogućava unapređenje prediktivne moći pretkliničkih ispitivanja i može doprineti smanjenju troškova razvoja lekova na više načina. Sa jedne strane, može smanjiti broj potrebnih životinja tokom faza pretkliničkih ispitivanja, što doprinosi smanjenju ukupnih troškova testiranja lekova. Takođe, biomimичni modeli tumora mogu pouzdanije predvideti efikasnost i toksičnost lekova na humane maligne ćelije, čime se smanjuje rizik od neuspešnih kliničkih ispitivanja.

Brojna istraživanja ukazuju da se osetljivost na lekove značajno razlikuje u 3D modelima tumora u poređenju sa 2D kulturama. Ove razlike rezultat su kombinacije tri ključna faktora: prostorne organizacije ćelija, procenta proliferativno aktivnih ćelija i dostupnosti leka svim ćelijama u kulturi (Doctor i sar., 2020) (slika 1.9). Za razliku od ćelija u monosloju, ćelije u 3D modelima su prostorno organizovane u 3D strukture, što omogućava intenzivnije međućelijske interakcije, kao i interakcije ćelija sa vanćelijskim matriksom u modelima koji uključuju ovu komponentu. Drugo, procenat ćelija koje prolaze kroz ćelijski ciklus je u 3D kulturama znatno manji. Na primer, u modelima zasnovanim na sferoidima procenat proliferativno aktivnih ćelija iznosi 40–70 % u poređenju sa preko 90 % u

monosloju (*Doctor i sar., 2020*), a upravo su ove ćelije česta meta antitumorskih lekova. Pored toga, dostupnost lekova u 3D modelima je ograničena postojanjem gradijenta koncentracije, što više odgovara *in vivo* uslovima, dok su ćelije u monosloju jednako izložene lekovima, što često dovodi do pogrešne procene efikasnosti leka.



Slika 1.9. Ključni faktori koji utiču na različitu osetljivost 2D i 3D kultura malignih ćelija na lekove (na primeru sferoida): prostorna organizacija ćelija, procenat proliferativno aktivnih ćelija i dostupnost leka svim ćelijama u kulturi (prilagođeno iz *Doctor i sar., 2020*)

Imajući u vidu njihov značaj, razvijen je veliki broj različitih 3D *in vitro* modela tumora, koji se razlikuju po stepenu složenosti, načinu formiranja i sposobnosti da imitiraju mikrookruženje tumora. Njihov pregled dat je u narednom poglavlju.

1.4. 3D *in vitro* modeli malignih tumora

3D *in vitro* modeli malignih tumora obično se sastoje od tri osnovne komponente: ćelija, nosača i uređaja. Na osnovu primene ovih komponenti, ovi modeli se mogu podeliti na:

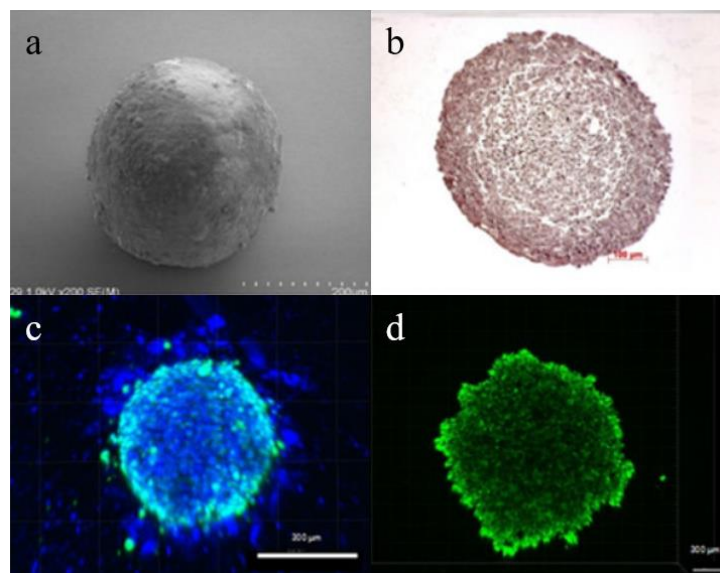
- 1) **modele bez nosača**, kao što su sferoidi i organoidi, koji nastaju samoorganizacijom ćelija,
- 2) **modele zasnovane na nosačima**, u kojima različiti biomaterijali u formi nosača podržavaju rast ćelija, i
- 3) **modele zasnovane na uređajima**, koji uključuju mikrofluidne i bioreaktorske sisteme za preciznu kontrolu uslova kulture.

1.4.1. Modeli bez nosača

Sferoidi i organoidi predstavljaju 3D modele koji su sastavljeni isključivo od ćelija i najčešće ne zahtevaju upotrebu nosača. Sferoidi su jednostavni i široko korišćeni modeli, posebno u testiranju lekova, dok organoidi predstavljaju naprednije modele, sa većim stepenom samoorganizacije i funkcionalnosti.

1.4.1.1. Sferoidi

Višećelijski sferoidi nastaju iz suspenzije pojedinačnih ćelija koje se gaje u medijumu sa dodatkom seruma, bez faktora rasta, u neadherentnim uslovima, kako bi se sprečilo vezivanje ćelija za podlogu i podstaklo međusobno vezivanje ćelija. Neke od metoda za dobijanje sferoida uključuju metodu viseće kapljice (eng. *hanging drop method*), sejanje u mikrotitar pločama sa ultramalim vezivanjem (engl. *ultra-low attachment plates*), tehniku tečnog sloja (engl. *liquid overlay technique*), gde se posuda za ćelijsku kulturu prekriva tankim slojem inertnog supstrata poput agaroze, i gajenje ćelija u rotirajućim sistemima (Weiswald i sar., 2015). U zavisnosti od ćelijske linije i metode, za formiranje kompaktnog sferoida potrebno je 1-7 dana (Weiswald i sar., 2015). Važno je napomenuti da ćelije koje nisu čvrsto povezane i ne formiraju kompaktne strukture, a koje se u literaturi često pogrešno nazivaju sferoidima, zapravo to nisu (Doctor i sar., 2020). Sferoide odlikuje pravilan, sferičan oblik, prisustvo malignih ćelija i sposobnost da se održe kao kulture u suspenziji (Weiswald i sar., 2015). U početku su sferoidi formirani isključivo od malignih ćelija, ali se danas često gaje u kokulturama sa imunim ćelijama, fibroblastima i endotelnim ćelijama kako bi se vernije oponašale heterogene interakcije u tumorskom tkivu (Bregenzler i sar., 2019). Dimenzije sferoida mogu varirati od nekoliko stotina mikrometara do 3 mm, pri čemu stepen kompaktnosti zavisi od ćelijske linije i metode gajenja. Kod sferoida čiji je prečnik veći od 400 µm, u njihovoj unutrašnjosti se može formirati jezgro sastavljeno od hipoksičnih, mirujućih ćelija, dok se u spoljašnjem sloju nalaze ćelije koje proliferišu, što oponaša formiranje hipoksičnih regija prisutnih u tumorima *in vivo* (Bregenzler i sar., 2019) (slika 1.10).



Slika 1.10. Karakteristike višćelijskih sferoida: a) pravilan, sferični oblik sferoida prikazan svetlosnom mikroskopijom; b) heterogeni sastav sferoida prikazan hematoksilin-eozin (H&E) bojenjem histološkog preseka; c) distribucija živih ćelija prikazana fluorescentnim bojenjem bojama DAPI (plavo–boji jedra živih ćelija) i kalcein-AM (CAM, zeleno–boji citoplazmu živih ćelija); d) prikaz formiranja gradijenta koncentracije usled pasivnog transporta fluorescentnog markera CAM (prilagođeno iz *Doctor i sar., 2020*)

Modeli na bazi sferoida imaju jasno definisanu geometriju i ponovljiv raspored različitih ćelijskih subpopulacija, što odražava *in vivo* uslove u pogledu oblika ćelija i njihovog okruženja (*Fitzgerald i sar., 2015*). Istraživanja su pokazala da višćelijski sferoidi imaju veću sličnost sa primarnim tumorima u pogledu morfologije ćelija, međućelijskih veza, proliferativnog indeksa i aktivacije signalnih puteva koji regulišu proliferaciju i preživljavanje ćelija u odnosu na ćelije gajene u monosloju (*Lawlor i sar., 2002*). Višćelijski sferoidi se prvenstveno primenjuju u testiranju lekova jer reprodukuju metaboličke i proliferativne gradijente karakteristične za tumore *in vivo* (*Gong i sar., 2015; Lee i Kim, 2021*). Nedostaci ovih modela uključuju odsustvo vanćelijskog matriksa, koji je jedna od glavnih strukturnih komponenti mikrookruženja tumora (*Monteiro i sar., 2021*), kao i ograničenu primenu na određene tipove ćelija, budući da ne mogu sve ćelijske linije da formiraju sferoide (*Carlsson i sar., 1983*).

1.4.1.2. Organoidi

Organoidi predstavljaju minijaturne, pojednostavljene verzije organa koje nastaju samoorganizacijom matičnih ćelija u trodimenzionalnom okruženju. Za njihovo formiranje mogu se koristiti embrionalne matične ćelije, indukovane pluripotentne matične ćelije i somatske matične ćelije, koje se uzgajaju u ili na 3D matriksu, kao što su kolagen i Matrigel (biološki hidrogel bogat proteinima vanćelijskog matriksa). U takvim uslovima matične ćelije prolaze kroz procese proliferacije, diferencijacije i samoorganizacije, pri čemu formiraju „mini-organe” koji strukturno i funkcionalno podsećaju na tkivo porekla (*Nagle i sar., 2018; Xu i sar., 2018*). Zbog toga organoidi zadržavaju određene karakteristike originalnog tkiva (*Doctor i sar., 2020*). Organoidi se mogu dobiti iz zdravih tkiva, uključujući bubrege, pluća, jetru, mozak i debelo crevo, kao i iz tumorskih tkiva, poput malignih tumora dojke, prostate, pankreasa, jetre, debelog creva i glioblastoma (*Bregenzler i sar., 2019*). Relativno su jednostavni za održavanje i umnožavanje (*Nagle i sar., 2018*). Iako se za dobijanje organoida mogu koristiti komercijalne ćelijske linije, najčešće se koriste ćelije dobijene iz tkiva pacijenata, čime se omogućava razvoj modela koji verno odražavaju specifične genetske i fenotipske karakteristike konkretnih bolesti. Na taj način, ova tehnologija nalazi primenu u personalizovanoj medicini, jer se pomoću organoida dobijenih od pacijenata može predvideti odgovor na terapiju i prilagoditi lečenje svakom pojedinačnom pacijentu, što je ispitivano kod pacijenata sa

karcinomom jajnika (*Nero i sar., 2021*). Organoidi tumora su korišćeni i u ispitivanju glioblastoma, kako bi se analizirala invazivnost u zdravo nervno tkivo (*da Silva i sar., 2018*), kao i za ispitivanje biologije humanog digestivnog trakta u zdravim i patološkim uslovima (*Taelman i sar., 2022*).

Ipak, modeli zasnovani na organoidima tumora imaju određena ograničenja. Iako se mogu dobiti iz različitih tipova malignih tumora i imaju dobru ponovljivost, ovi modeli ne predstavljaju u potpunosti *in vivo* uslove, jer im najčešće nedostaju vaskularna mreža i funkcionalne imunološke komponente. Takođe, nije moguće precizno kontrolisati vanćelijski matriks, s obzirom na to da su uglavnom zasnovani na neadherentnim kulturama, dok su modeli koji koriste Matrigel podložni varijacijama od serije do serije (*Bregenzler i sar., 2019*). Iako organoidi imaju veliki potencijal za proučavanje biologije malignih tumora i primenu u personalizovanoj medicini, potrebna su dodatna istraživanja kako bi ovaj model sistem dostigao svoj puni potencijal.

1.4.2. Modeli zasnovani na nosačima

1.4.2.1. Biomaterijali

U cilju imitacije vanćelijskog matriksa u *in vitro* uslovima, razvijeni su modeli zasnovani na nosačima, koji koriste biomaterijale kao veštački vanćelijski matriks u 3D kulturama ćelija. Ovaj veštački matriks ćelijama pruža strukturnu i adhezivnu podršku, omogućavajući njihov rast, međusobne interakcije i interakcije sa mikrookruženjem (*Abuwatfa i sar., 2024*). Pored toga, njegova uloga uključuje i obezbeđivanje odgovarajućih biofizičkih signala, čime se dodatno utiče na ćelije (*Bregenzler i sar., 2019*).

Biomaterijali koji se koriste u 3D *in vitro* modelima se prema hemijskom sastavu mogu podeliti na organske (pretežno polimerne), neorganske (najčešće keramičke) i kompozitne, koji predstavljaju kombinaciju dva ili više biomaterijala. Posebnu grupu biomaterijala čini decelularizovani vanćelijski matriks, koji se dobija uklanjanjem ćelijskih komponenti iz tkiva, pri čemu se zahteva kompleksna struktura i sastav vanćelijskog matriksa tkiva.

1.4.2.1.1. Polimerni biomaterijali

Polimeri se široko koriste u izradi 3D nosača ćelija zbog svoje biokompatibilnosti, raznovrsnosti i mogućnosti modifikacije. Mogu se podeliti na prirodne i sintetičke polimere. Prirodni polimeri uključuju polimere na bazi proteina i polimere na bazi polisaharida. Polimeri na bazi proteina predstavljaju makromolekule sastavljene od aminokiselina, a neki od najčešće korišćenih su kolagen, želatin, protein svile (fibroin) i fibronektin. Zahvaljujući svojim bioaktivnim karakteristikama, ovi polimeri omogućavaju adheziju ćelija i mogu regulisati njihovo ponašanje i razvoj tkiva (*Abuwatfa i sar., 2024*). Sa druge strane, polimeri na bazi polisaharida sastoje se od dugačkih lanaca molekula šećera, a neki od najčešće korišćenih su hijaluronska kiselina, hitozan, alginat i agaroz. Prirodni polimeri su biokompatibilni, biodegradabilni i često se mogu modifikovati kako bi se postigle željene fizičke i biološke osobine (*Asghar i sar., 2015; Abuwatfa i sar., 2024*). Ipak, primena prirodnih polimera je ograničena zbog potencijalne imunogenosti, kao i varijabilnosti između serija, što smanjuje eksperimentalnu ponovljivost (*Braccini i sar., 2022*).

U okviru prirodnih biomaterijala, poseban tip koji se veoma često koristi zahvaljujući svojoj sličnosti sa prirodnim vanćelijskim matriksom je komercijalno dostupan Matrigel. Ovaj materijal predstavlja kompleksnu mešavinu proteina i faktora rasta vanćelijskog matriksa, izolovanih iz tumorskog tkiva mišjeg sarkoma, i još uvek se smatra industrijskim standardom za zamenu vanćelijskog matriksa u brojnim 3D *in vitro* modelima (*Leung i sar., 2010*). Matrigel omogućava ispoljavanje biološki relevantnih ćelijskih odgovora, uključujući reorganizaciju citoskeleta i promene u morfologiji ćelija koje su povezane sa malignim fenotipom, kao što je izdužen oblik ćelija karakterističan za invazivno ponašanje. Ipak, slabe mehaničke karakteristike Matrigela ograničavaju njegovo korišćenje na kulture ćelija u monosloju ili u tankom sloju gela, kao i na kratkotrajne analize u trajanju od nekoliko sati do najviše 4 dana (*Cavo i sar., 2018*). Takođe, zbog svog biološkog porekla i složenog sastava,

Matrigel nije precizno definisan matriks, što može dovesti do varijabilnosti eksperimentalnih rezultata (Hughes i sar., 2010). Dodatno, materijali izolovani iz sisara mogu biti izvor patogena i često su skupi za dobijanje (Leung i sar., 2010).

Sintetički polimeri koji se koriste za izradu 3D nosača obuhvataju širok spektar materijala, uključujući poli(hidroksietil metakrilat), poli(vinil alkohol), poli(etilen glikol), poli(akrilnu kiselinu), poli(metakrilnu kiselinu) i poli(akrilamid), zatim biorazgradive poliestre poput poli(mlečne kiseline), poli(glikolne kiseline) i poli(mlečno-ko-glikolne kiseline), kao i polistiren (Asghar i sar., 2015). Ovi materijali omogućavaju preciznu kontrolu svojstava nosača, uključujući mehaničku čvrstoću, brzinu degradacije i poroznost strukture. Međutim, za razliku od prirodnih polimera, sintetički materijali najčešće nisu biološki aktivni, zbog čega ćelije prema njima pokazuju manji afinitet (Braccini i sar., 2022). Pored toga, razgradnja mnogih sintetičkih polimera može dovesti do stvaranja kiselih proizvoda, pri čemu dolazi do snižavanja lokalne pH vrednosti, što može imati citotoksičan efekat (Sung i sar., 2004).

Kako bi se poboljšale karakteristike polimernih nosača, kao i njihov uticaj na ćelije, često se kombinuju sa drugim polimerima ili keramičkim biomaterijalima. Kombinovanjem različitih polimera omogućava se podešavanje mehaničkih, hemijskih i bioloških svojstava materijala, čime se postiže kompleksnije mikrookruženje koje bolje imitira *in vivo* uslove (Ulrich i sar., 2010; Cavo i sar., 2018). Ovakvi sistemi doprinose formiranju heterogenog mikrookruženja koje podržava morfološku heterogenost, zonalnu organizaciju i migratorni potencijal tumorskih ćelija, kao i fenotipske promene povezane sa tumorskom progresijom (Moscatto i sar., 2015; Pradhan i sar., 2017).

1.4.2.1.2. Keramički biomaterijali

Keramički biomaterijali predstavljaju grupu neorganskih materijala koji se odlikuju velikom mehaničkom čvrstoćom, hemijskom stabilnošću i bioaktivnošću. U 3D nosačima ćelija najčešće se koriste kalcijum-fosfatni materijali, uključujući hidroksiapatit, trikalcijum-fosfat, amorfne i dvofazne kalcijum-fosfate, kao i bioaktivna stakla (Gerhardt i Boccaccini, 2010; Samavedi i sar., 2013). Kalcijum-fosfatni materijali, posebno hidroksiapatit, po hemijskom sastavu i strukturi su slični mineralnoj komponenti kosti, pa se često koriste u nosačima za oponašanje mikrookruženja kosti i osteosarkoma (LeGeros, 2002; Monteiro i sar., 2019). Pored toga, njihova primena je zabeležena i u modelima karcinoma dojke, gde može doći do formiranja mikrokalcifikacija, odnosno lokalnog deponovanja hidroksiapatita (Svanström i sar., 2021).

Iako se odlikuju značajnom krutošću i stabilnošću, kalcijum-fosfatni materijali su u poroznom obliku krti, što može ograničiti njihovu primenu kao samostalnih nosača (Baino i sar., 2015). Zbog toga se najčešće kombinuju sa polimernim materijalima dajući kompozitne nosače ćelija.

1.4.2.1.3. Kompozitni biomaterijali

Kompozitni biomaterijali nastaju kombinovanjem dve ili više komponenti, najčešće polimera i keramičkih biomaterijala, sa ciljem prevazilaženja ograničenja pojedinačnih materijala i poboljšanja svojstava finalnog sistema. Keramički biomaterijali, zbog krтости i male otpornosti na lom, imaju ograničenu primenu, dok polimerni materijali najčešće poseduju elastičnost i biokompatibilnost, ali nedovoljnu mehaničku čvrstoću i bioaktivnost. Kombinacija ove dve vrste biomaterijala u okviru kompozitnih nosača omogućava balans između mehaničke stabilnosti i biološke funkcionalnosti (Ikada, 2006).

U 3D modelima tumora, kombinovanje polimernih i keramičkih materijala omogućava kontrolu određenih karakteristika ćelijskog mikrookruženja koje mogu uticati na ponašanje ćelija. Podešavanje mehaničkih i bioaktivnih svojstava nosača dovodi do promena u proliferaciji, infiltrativnom ponašanju i genskoj ekspresiji tumorskih ćelija (Bassi i sar., 2020; Tornín i sar., 2021).

1.4.2.1.4. Decelularizovani vanćelijski matriks

Za oponašanje vanćelijskog matriksa u 3D kulturama često se koristi i decelularizovani vanćelijski matriks, koji ćelijama pruža prirodnu sredinu za adheziju, rast i interakcije sa drugim ćelijama i vanćelijskim matriksom (Zhang i sar., 2022). Dobijaju se od tkiva iz kojih su uklonjene sve ćelijske komponente, pri čemu ostaje samo vanćelijski matriks. Može poticati iz različitih izvora, uključujući zdrava i maligna tkiva, kao i iz specifičnih delova tkiva bogatih vanćelijskim matriksom, poput decelularizovane bazalne membrane (Hoshiba, 2019; Abuwatfa i sar., 2024). Upotreba decelularizovanog vanćelijskog matriksa kao 3D nosača za ćelijsku kulturu ima brojne prednosti. Pre svega, on zadržava kompleksan sastav i arhitekturu vanćelijskog matriksa, omogućavajući malignim ćelijama da ostvaruju interakcije slične onima u nativnom tkivu. Pored strukturnih proteina i signalnih molekula koji utiču na adheziju, migraciju i diferencijaciju, očuvana topografija, poput vaskularne mreže, omogućava proučavanje angiogeneze i procesa vaskularizacije tokom progresije malignih tumora, dok istovremeno obezbeđuje mehaničke signale koji utiču na oblik, proliferaciju i gensku ekspresiju ćelija (Abuwatfa i sar., 2024). Poreklo decelularizovanog vanćelijskog matriksa značajno utiče na ponašanje ćelija. Matriks dobijen iz malignog tkiva može da podstakne proliferaciju i epitelno-mezenhimalnu tranziciju, proces tokom kojeg dolazi do smanjene ekspresije gena odgovornih za epitelne karakteristike i povećane ekspresije gena povezanih sa mezenhimskim fenotipom, što je povezano sa povećanom invazivnošću ćelija, dok matriks poreklom iz zdravog tkiva može da inhibira ove procese i indukuje apoptozu (Jin i sar., 2018).

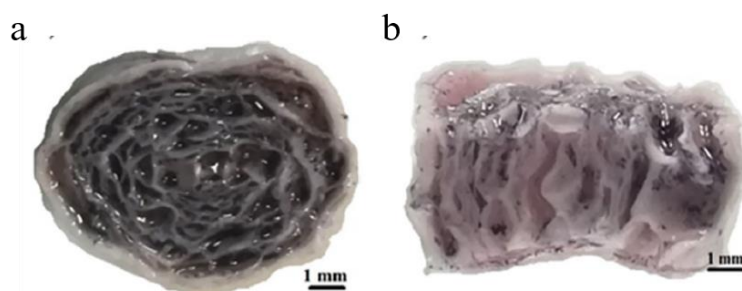
Glavna ograničenja korišćenja decelularizovanog vanćelijskog matriksa uključuju mogućnost oštećenja njegove strukture tokom procesa decelularizacije, što dovodi do gubitka važnih signalnih molekula, kao i ograničenu dostupnost uzoraka iz pacijenata usled etičkih i regulatornih zahteva (Brancato i sar., 2020). Dodatno, heterogenost tumora otežava interpretaciju rezultata, jer se sastav vanćelijskog matriksa razlikuje u zavisnosti od stadijuma bolesti, invazivnosti i drugih karakteristika (Hoshiba, 2019).

1.4.2.2. Metode imobilizacije ćelija

Ćelije se u 3D modelima zasnovanim na nosačima mogu imobilisati na više načina, pri čemu najčešće korišćene metode uključuju adsorpciju na površini nosača i imobilizaciju ili zadržavanje unutar matriksa.

1.4.2.2.1. Adsorpcija na površini nosača

Adsorpcija predstavlja način imobilizacije ćelija pri kojem se one zasejavaju na već formirane nosače i vezuju za njihovu površinu (slika 1.11). Ovaj proces je zasnovan na interakcijama između ćelija i površine materijala, koje su određene njegovim karakteristikama (Braccini i sar., 2022). Kao posledica toga, ćelije se inicijalno raspoređuju na površini i u dostupnim porama nosača, dok njihova dalja penetracija u unutrašnjost zavisi od njegove strukture i poroznosti.



Slika 1.11. Pogled odozgo (a) i poprečni presek (b) nosača na bazi alginata i čestica hidroksiapatita i β -trikalcijum fosfata sa zasejanim ćelijama osteosarkoma obojenim MTT reagensom (crno) (razmernik = 1 mm; prilagođeno iz Banicevic i sar., 2025)

Ovaj pristup omogućava primenu širokog spektra biomaterijala i preciznu kontrolu strukture i fizičko-hemijskih svojstava nosača, čime se olakšava oponašanje karakteristika prirodnog vanćelijskog matriksa. Međutim, s obzirom na to da se ćelije seju na već formirane nosače, njihova penetracija u unutrašnjost može biti ograničena, što često dovodi do nehomogene raspodele i zadržavanja ćelija u površinskim slojevima. Kako bi se poboljšala efikasnost sejanja, mogu se primeniti različiti pristupi koji unapređuju kontakt ćelija i nosača, kao što je dinamičko sejanje u sudovima sa mešanjem ili u protočnim uslovima (*Chan i Leong, 2008*). Važan faktor predstavljaju i dimenzije nosača. Tanji nosači (debljine < 2 mm) mogu se sejati statički, dok je za uniformnu raspodelu ćelija u debljim nosačima (≥ 2 mm) neophodno primeniti mešanje (*Vunjak-Novakovic i Radisic, 2004*). Iako ovakvi pristupi povećavaju efikasnost sejanja, mogu imati negativan uticaj na vijabilnost ćelija usled izlaganja ćelija smicajnim silama tokom mešanja (*Chan i Leong, 2008*).

S obzirom na to da karakteristike materijala utiču na interakcije ćelija sa nosačem, površina nosača može se dodatno funkcionalizovati (mehanički, fizički, hemijski ili biološki) kako bi se poboljšala adhezija ćelija (*Tallawi i sar., 2015*).

1.4.2.2.2. Zadržavanje unutar matriksa

Zadržavanje ćelija unutar matriksa predstavlja način imobilizacije ćelija pri kojem se one ugrađuju unutar trodimenzionalnog matriksa, najčešće hidrogela. Hidrogelovi koji se koriste za imobilizaciju formiraju se umrežavanjem rastvorljivih polimera, pri čemu uslovi formiranja hidrogela moraju biti kompatibilni sa živim ćelijama. Jedna od prednosti ovog pristupa je mogućnost mešanja ćelija sa polimernom suspenzijom pre samog umrežavanja, čime se istovremeno ostvaruju formiranje nosača i imobilizacija ćelija. Ovakav pristup omogućava homogenu raspodelu ćelija unutar matriksa i očuvanje njihove vijabilnosti (*Chan i Leong, 2008*).

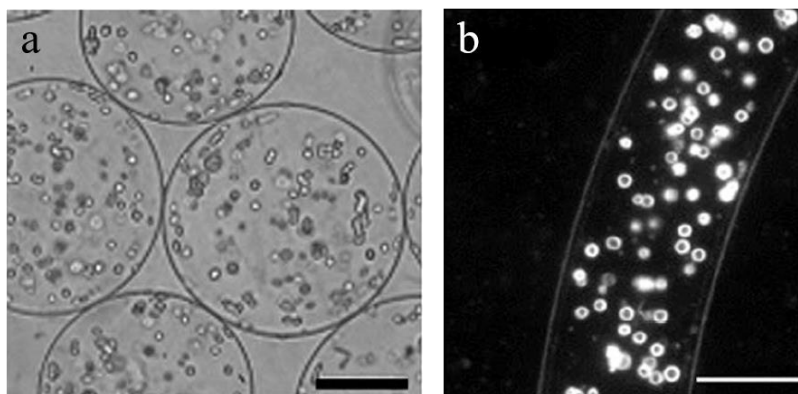
Hidrogelovi se mogu formirati fizičkim i hemijskim umrežavanjem polimernih lanaca. Fizičko umrežavanje se zasniva na nekovalentnim interakcijama, uključujući vodonične veze, elektrostatičke interakcije i jonsko umrežavanje, dok hemijsko podrazumeva formiranje kovalentnih veza između polimernih lanaca. Formiranje hidrogelova može se postići i promenama spoljašnjih uslova, kao što su temperatura i pH vrednost. Od navedenih metoda, jonsko umrežavanje se često koristi zbog blagih uslova geliranja pogodnih za imobilizaciju ćelija (*Maji i Lee, 2022*).

U zavisnosti od umreživača i mehanizma umrežavanja, hidrogel može biti dugotrajno stabilan ili degradabilan. Stabilni hidrogelovi često ograničavaju kretanje ćelija i formiranje vanćelijskog matriksa, dok degradabilni hidrogelovi omogućavaju rast i migraciju ćelija i stimulišu vanćelijskog matriksa (*Maji i Lee, 2022*).

Ekstruzija predstavlja jednu od najčešće korišćenih tehnika za imobilizaciju ćelija u polimerne matrice. U preradi polimera, ekstruzija predstavlja postupak pri kome se rastopljeni polimer pod pritiskom potiskuje kroz matricu (diznu), čime se dobija proizvod konstantnog poprečnog preseka (*Francis, 2016*). U inženjerstvu tkiva, termin ekstruzija se najčešće odnosi na istiskivanje polimerne suspenzije sa ćelijama kroz iglu ili kanilu u rastvor za geliranje, gde dolazi do formiranja hidrogela sa imobilisanim ćelijama. Ekstruzione tehnike se najčešće koriste za dobijanje nosača u obliku čestica, jer sferični oblik povećava otpornost gela i kontaktnu površinu, što povoljno utiče na preživljavanje ćelija (*Sánchez i sar., 2013*). Za dobijanje veoma malih čestica (prečnika nekoliko stotina mikrometara) ima više tehnika, a jedna od njih je elektrostatička ekstruzija (slika 1.12a). Procesni parametri, kao što su viskoznost rastvora, protok, prečnik igle i uslovi geliranja, utiču na veličinu i morfologiju dobijenih čestica (*Sánchez i sar., 2013*).

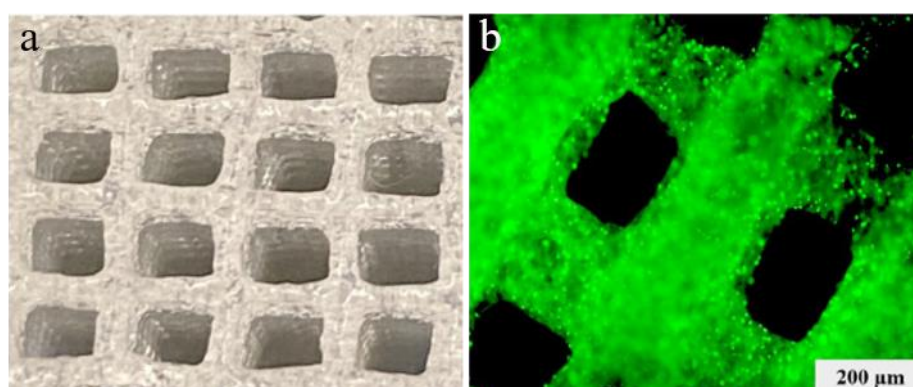
Pored formiranja čestica, ekstruzija se koristi i za dobijanje mikrovlakana. Ovakav oblik se odlikuje velikom specifičnom površinom i pogodnim uslovima za rast ćelija (*Xie i sar., 2022*). Mikrovlakna se mogu formirati kontinualnim istiskivanjem polimerne suspenzije sa ćelijama u rastvor za geliranje, pri čemu se istiskivanje može ostvariti pomoću pumpe ili ručno (*Stojkovska, 2015; Stojkovska i sar., 2020; Dragoj i sar., 2021*). Prednost upotrebe pumpe u odnosu na ručno istiskivanje je u održavanju

konstantne brzine potiskivanja, čime se postiže ujednačen prečnik mikrovlakna, dok je ručno istiskivanje pogodno za rad sa malim zapreminama. Za dobijanje strukturno složenijih mikrovlakana koristi se koaksijalna ekstruzija, pri kojoj se dva različita materijala istovremeno potiskuju kroz koaksijalnu iglu, formirajući jezgro i omotač (*Wang i sar., 2018a*) (slika 1.12b).



Slika 1.12. Primeri hidrogelova sa imobilisanim ćelijama dobijenih ekstruzijom. a) Dvofazne mikročestice na bazi alginata i poli-L-lizina sa pojedinačnim ćelijama hepatokarcinoma dobijene elektrostatičkom ekstruzijom (razmernik = 100 μm , prilagođeno iz *Wang i sar., 2006*); b) Dvofazna mikrovlakna na bazi alginata i hijaluronske kiseline sa pojedinačnim ćelijama glioma dobijene koaksijalnom ekstruzijom (razmernik = 200 μm ; prilagođeno iz *Li i sar., 2018*)

Ekstruzija je jedna od najčešće primenjivanih metoda u bioštampanju, jer omogućava korišćenje širokog spektra materijala i jednostavnu kontrolu procesa (*Gao i sar., 2019*). 3D bioštampanje predstavlja tehnologiju u kojoj se biomaterijali sa ćelijama prostorno nanose sloj po sloj, na osnovu unapred definisanog kompjuterskog dizajna, čime se omogućava dobijanje složenih *in vitro* modela sa jasno definisanom i precizno kontrolisanom 3D strukturom, uz očuvanje vijabilnosti ćelija (*Zhao i sar., 2014*; *Guan i Huang, 2022*) (slika 1.13). Dodatno, savremene metode 3D bioštampanja omogućavaju kontrolisanu prostornu raspodelu različitih tipova ćelija (npr. malignih i stromalnih), što može poboljšati kompleksnost *in vitro* modela, kao i standardizaciju i ponovljivost rezultata (*Xu i sar., 2011*). Ipak, bioštampanje zahteva optimizaciju velikog broja parametara koji mogu uticati na vijabilnost ćelija, a složenost sistema i potreba za specijalizovanom opremom čine ovu tehnologiju vremenski zahtevnom i skupom (*Mota i sar., 2020*; *Gebeyehu i sar., 2021*).



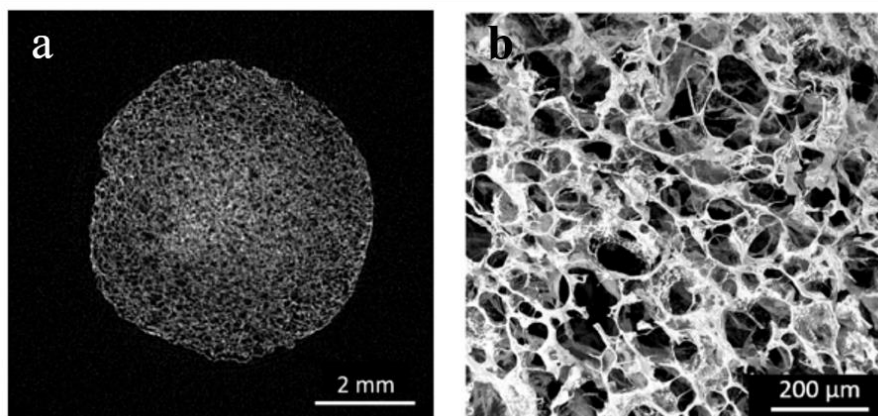
Slika 1.13. Primer modela dobijenog 3D bioštampanjem: a) fotografija poroznog 3D bioštampanog nosača i b) mikrofotografija živih ćelija unutar nosača (fluorescentno obojenih sa CAM; razmernik = 200 μm) (prilagođeno iz *Gebeyehu i sar., 2021*)

1.4.2.3. Karakteristike nosača

1.4.2.3.1. Struktura

Struktura nosača predstavlja ključni faktor koji utiče na transport nutrijenata, kiseonika i metabolita, kao i na organizaciju ćelija u 3D sistemu. U skladu sa navedenim metodama imobilizacije koriste se mikro- i makroporozni nosači ili polimerni nosači koji imaju pore nano veličina.

Mikro- i makroporozna struktura nosača obezbeđuje prostor za adheziju, rast i migraciju ćelija, njihove međusobne interakcije, kao i transport nutrijenata i metabolita (Carletti i sar., 2010; Bregenzer i sar., 2019). Pore povećavaju specifičnu površinu, čime se povećava dostupna površina za adheziju ćelija, dok veći udeo pora omogućava njihov rast i efikasnu razmenu materija. Pri tome, veličina pora i hemijski sastav materijala imaju značajnu ulogu u regulaciji proliferacije, organizacije citoskeleta, interakcija sa nosačem i formiranja ćelijskih agregata (Harley i sar., 2008; Veleirinho i sar., 2013; Li i sar., 2015). Mikroporoznost je značajna za interakcije ćelija sa matriksom, dok makroporoznost ima važnu ulogu u difuziji nutrijenata i uklanjanju metaboličkih produkata (Carletti i sar., 2010). Pored veličine pora, i njihova morfologija i međusobna povezanost utiču na ponašanje ćelija i formiranje vanćelijskog matriksa. Optimalna poroznost zavisi od tipa tkiva. Na primer, u modelima koštanog tkiva, minimalna veličina pora od oko 100 μm je neophodna zbog veličine ćelija, migracije i transporta nutrijenata, dok se veličine pora veće od 300 μm povezuju sa efikasnijim formiranjem tkiva (Karageorgiou i Kaplan, 2005). Ipak, povećanje poroznosti često dovodi do smanjenja mehaničke stabilnosti, zbog čega je neophodno uspostaviti balans između strukturne stabilnosti i biološke funkcionalnosti nosača. Na slici 1.14 prikazane su mikrofotografije strukture tipičnog mikroporoznog nosača.



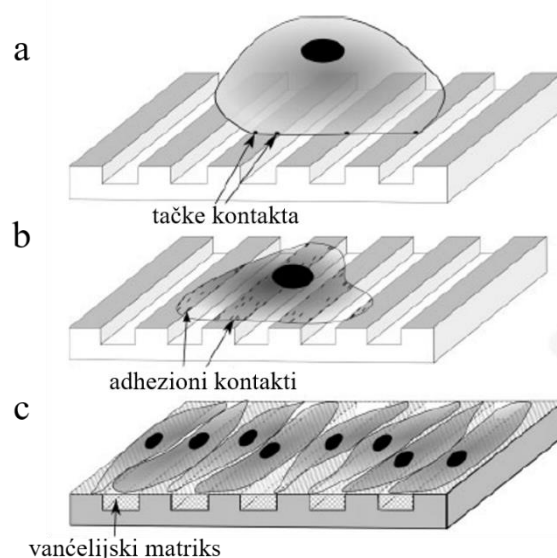
Slika 1.14. Prikaz strukture poroznog nosača na bazi kolagena i nanočestica HAP: a) poprečni presek koji prikazuje homogenu distribuciju pora po celom preseku nosača (razmernik = 2 mm); b) mikrofotografija dobijena skenirajućom elektronskom mikroskopijom koja detaljnije prikazuje poroznu strukturu nosača (razmernik = 200 μm) (prilagođeno iz Tornin i sar., 2021)

Hidrogelovi predstavljaju trodimenzionalne mreže hidrofilnih polimera koje mogu da apsorbuju velike količine vode ili bioloških tečnosti i istovremeno očuvaju svoju strukturu (Abuwatfa i sar., 2024). Čvrsta faza hidrogelova sastoji se od umreženih polimernih lanaca, pri čemu veličina pora (engl. *mesh size*), koja opisuje poroznost na molekulskom nivou i koja se tipično nalazi u opsegu nanometarskih dimenzija, predstavlja važan parametar koji utiče na transport molekula kroz matriks (Caliari i Burdick, 2016; Ho i sar., 2022). Ova mreža omogućava zadržavanje vode i održavanje strukturne stabilnosti hidrogela, uz istovremenu propustljivost za rastvorene supstance (Ho i sar., 2022). Sadržaj vode u hidrogelu može dostići i do 99 %, što dodatno doprinosi efikasnoj difuziji nutrijenata i metabolita kroz materijal (Asghar i sar., 2015; Brancato i sar., 2020). Gustina i organizacija mreže mogu uticati na ponašanje ćelija, pri čemu veća gustina može ograničiti njihovo kretanje kroz matriks (Ulrich i sar., 2010).

1.4.2.3.2. Topografija

Topografija biomaterijala odnosi se na mikro- i nanoskopske strukturne karakteristike površine, uključujući reljef, geometriju i organizaciju površinskih elemenata, koje mogu značajno uticati na interakcije između ćelija i nosača. Iako ćelije u *in vitro* uslovima ne dolaze u direktan kontakt sa površinom nosača, već sa slojem vode, jona i biomolekula adsorbovanih iz medijuma, informacije o fizičko-hemijskim i topografskim karakteristikama materijala prenose se na ćelije posredstvom ovog sloja (Anselme i Bigerelle, 2011).

Ćelijski odgovor na topografiju obuhvata niz mehanosenzitivnih procesa, pri čemu se ćelije mogu orijentisati i menjati oblik u zavisnosti od anizotropije površine, što je poznato kao kontaktno vođenje (engl. *contact guidance*) (slika 1.15). Ovaj proces je povezan sa reorganizacijom citoskeleta i mehanotransdukcijom, pri čemu topografski signali utiču na morfologiju ćelija i jedra, što može dalje uticati na gensku ekspresiju i proliferaciju (Anselme i Bigerelle, 2011).



Slika 1.15. Prikaz ćelijskog odgovora na žlebastu topografiju: a) inicijalna adhezija ćelija; b) širenje i usmeravanje ćelija u pravcu žlebova; c) proliferacija i orijentacija ćelija usled efekta kontaktnog vođenja (prilagođeno iz Anselme i Bigerelle, 2011)

Kod tumorskih ćelija pokazano je da topografski signali mogu različito uticati na proliferaciju u poređenju sa normalnim ćelijama. Anizotropne mikrotopografske strukture, poput mikrožlebova, mogu smanjiti proliferaciju normalnih epitelnih ćelija dojke, dok isti efekat nije uočen kod malignih ćelija, koje zadržavaju sposobnost nekontrolisane proliferacije, što ukazuje na njihovu smanjenu osetljivost na fizičke inhibicione signale mikrookruženja (Chaudhuri i sar., 2016). Pored proliferacije, topografija može uticati i na migratorno ponašanje tumorskih ćelija. Pokazano je da topografija može regulisati efikasnost i pravac širenja ćelija iz tumorskih sferoida, što ukazuje da karakteristike površine mogu doprineti regulaciji migracije u 3D modelima (Lam i sar., 2020). U tom kontekstu, modeli na bazi hidrogelova sa sličnom topografijom i mehaničkim karakteristikama kao tumorsko mikrookruženje podržavaju proliferaciju ćelija i formiranje ćelijskih agregata, a u poređenju sa standardnim 2D kulturama dovode do povećane migracije, invazivnosti i tumorogenog potencijala (Suo i sar., 2019).

1.4.2.3.3. Mehaničke karakteristike

Mehaničke karakteristike nosača zavise od više faktora, uključujući sam sastav biomaterijala, kao i njegovu strukturu. Kod hidrogelova, mehaničke karakteristike zavise od makromolekulske strukture polimera, stepena i načina umrežavanja, brzine razgradnje i stepena apsorpcije vode. Ovi parametri direktno određuju čvrstoću i elastičnost hidrogelova, kao i njihovo ponašanje u biološkim uslovima

(Braccini i sar., 2022). Hidrogelovi na bazi prirodnih polimera generalno pokazuju slabija mehanička svojstva u odnosu na sintetičke polimere, koja se mogu unaprediti kombinovanjem različitih polimera ili uvođenjem dodatnih komponenti. Na primer, dodatak sekundarne polimerne faze, kao što je agaroza u kolagenskim sistemima, dovodi do povećanja stabilnosti i formiranja gušće mrežaste strukture (Ulrich i sar., 2010). Slično tome, kombinacija materijala sa komplementarnim svojstvima, kao što su alginat i Matrigel, omogućava postizanje odgovarajuće mehaničke stabilnosti, pri čemu svojstva sistema, poput čvrstoće, zavise od sastava i odnosa komponenti (Cavo i sar., 2018). Kod keramičkih materijala, mehanička svojstva nosača u velikoj meri zavise od strukture i poroznosti, pri čemu povećanje poroznosti najčešće dovodi do smanjenja čvrstoće i modula elastičnosti (Baino i sar., 2015).

Mehanička svojstva nosača imaju značajan uticaj na ponašanje ćelija. Nakon imobilizacije, ćelije ostvaruju kontakt sa nosačem preko integrina, koji omogućavaju vezivanje za matriks i prenos mehaničkih signala u ćeliju. Na čvršćim nosačima dolazi do formiranja stabilnijih ćelijskih kontakata i izraženije organizacije citoskeleta, jer materijal pruža veći otpor silama koje ćelije generišu, dok je na mekšim nosačima taj efekat slabije izražen. Promene u organizaciji citoskeleta utiču na signalne puteve uključene u mehanotransdukciju, čime se mehanički signali iz mikrookruženja prevode u biohemijske odgovore (Braccini i sar., 2022). U kontekstu modela tumora, pokazano je da krutost mikrookruženja utiče na fenotip tumorskih ćelija, pri čemu povećana krutost može doprineti ispoljavanju malignih karakteristika i progresiji tumora (Bassi i sar., 2020). Takođe, u modelima zasnovanim na hidrogelovima, ćelije gajene na čvršćim nosačima mogu ispoljiti smanjenu senzitivnost na pojedine hemoterapeutike, što ukazuje na ulogu mehaničkih svojstava u regulaciji odgovora na terapiju (Nguyen i sar., 2014).

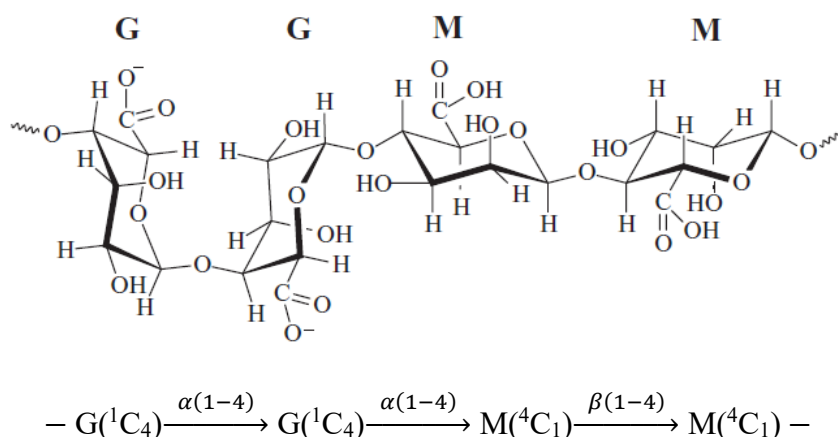
Dodatno, svojstva hidrogelova kao što su bubrenje i degradacija mogu uticati na mehaničko ponašanje sistema tokom vremena. Veći stepen bubrenja obično je povezan sa manjom gustinom umrežavanja i manjom krutošću, dok razgradnja dovodi do promena u strukturi i slabljenja mehaničkih svojstava matriksa, što dalje utiče na ćelijski odgovor (Caliari i Burdick, 2016).

1.4.2.4. Alginat

Alginat je prirodni nerazgranati polisaharid koji se nalazi u ćelijskom zidu i unutarćelijskom matriksu smeđih algi (*Phaeophyceae*), gde je prisutan u formi gela koji sadrži jone natrijuma, kalcijuma, magnezijuma, stroncijuma i barijuma čija je koncentracija određena ravnotežnom jonskom izmenom sa morskom vodom (Pawar i Edgar, 2012). Kao strukturni element, gel alginata daje tkivu algi mehaničku čvrstoću i fleksibilnost (Draget, 2009). Pored smeđih algi, alginat proizvode i bakterije iz familija *Pseudomonas* i *Azotobacter* (Hay i sar., 2013). Komercijalni alginat se pretežno dobija ekstrakcijom iz smeđih algi u formi rastvorljivog Na-alginata (Bojorges i sar., 2023). Alginati poreklom iz bakterija imaju velike molekulske mase i visok stepen polimerizacije, dok kod onih poreklom iz algi vrednost molekulske mase može da varira u širokom opsegu (50–100 000 kDa), zahvaljujući čemu alginat može da odgovori na zahteve različitih primena (Augst i sar., 2006; Sahoo i Biswal, 2021).

1.4.2.4.1. Hemijska struktura alginata

Alginat je linearni kopolimer kiselinskih ostataka β -D-manuronske kiseline (M) i α -L-guluronske kiseline (G) međusobno povezanih 1 $\rightarrow$ 4 glikozidnom vezom. M i G jedinice u alginatu izolovanom iz smeđih algi formiraju blokove duž lanca polimera, gde su duže homopolimerne M sekvence (MM blokovi) i G sekvence (GG blokovi) ispresecane znatno kraćim heteropolimernim sekvencama (MG blokovi) (slika 1.16) (Aarstad i sar., 2012). Ova nenasumična blok-struktura je posledica jedinstvenog procesa biosinteze alginata, gde prvo dolazi do polimerizacije manuronskih ostataka u polimanuronsku kiselinu, a zatim se epimerazama neacetilovani manuronski ostaci prevode u guluronske ostatke (Aarstad i sar., 2012; Pawar i Edgar, 2012).



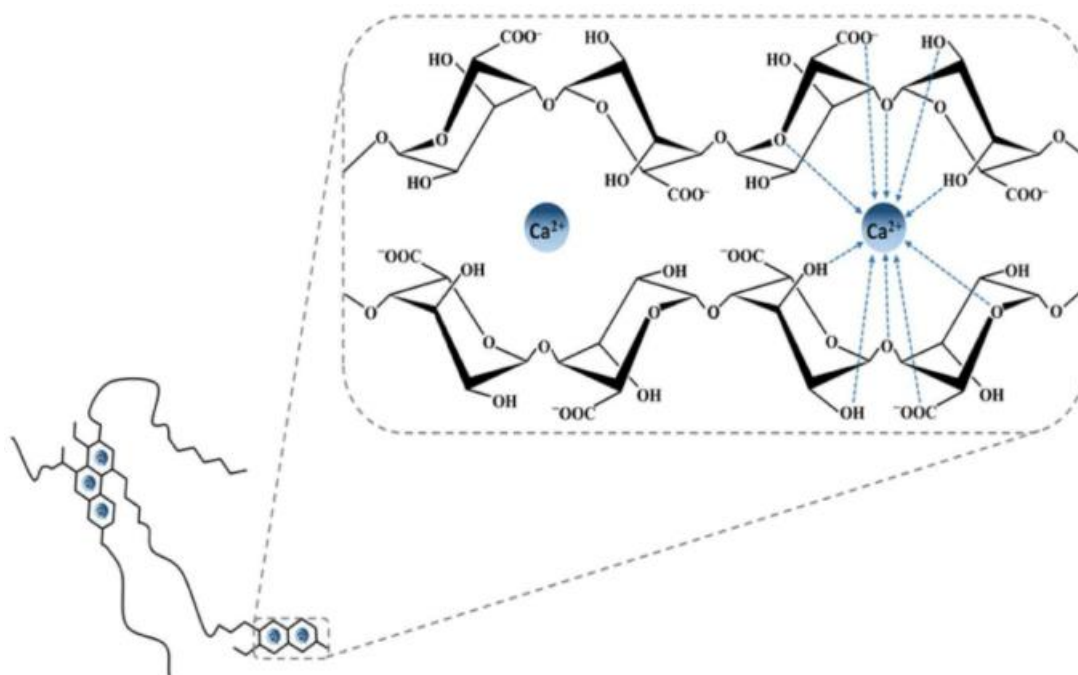
Slika 1.16. Molekulska struktura fragmenta alginata sastavljenog od GG-, GM- i MM- blokova (prilagođeno iz *Iwaki i sar., 2012*) i tipovi glikozidne veze koji se ostvaruju između različitih monomernih jedinica.

Sadržaj i redosled monomernih jedinica, dužina blokova i molekulska masa variraju u zavisnosti od izvora alginata i tkiva iz kojeg je izolovan, što dovodi do različitih fizičkih karakteristika dobijenih alginata (*Gombotz i Wee, 2012; Pawar i Edgar, 2012; Liu i sar., 2016*).

Vodeni rastvori alginata se ponašaju kao pseudoplastični nenjutnovski fluidi, odnosno viskoznost ovih rastvora opada sa porastom brzine smicanja (*Becker i Kipke, 2002*). Viskoznost rastvora alginata zavisi od koncentracije polimera i njegove molekulske mase (*Augst i sar., 2006*), ali i od temperature. Naime, viskoznost alginata se smanjuje sa porastom temperature, brzinom od oko 2,5 % po stepenu Celzijusa. Ako se alginatni rastvor drži na temperaturi iznad 50°C nekoliko sati, može doći do depolimerizacije, što dovodi do trajnog gubitka viskoznosti i molekulske mase. Viskoznost rastvora alginata je stabilna u opsegu pH 5–11, a dostiže maksimum na pH oko 3–3,5, jer se tada karboksilne grupe alginata protonizuju i formiraju vodonične veze (*LeRoux i sar., 1999; Qin, 2008*).

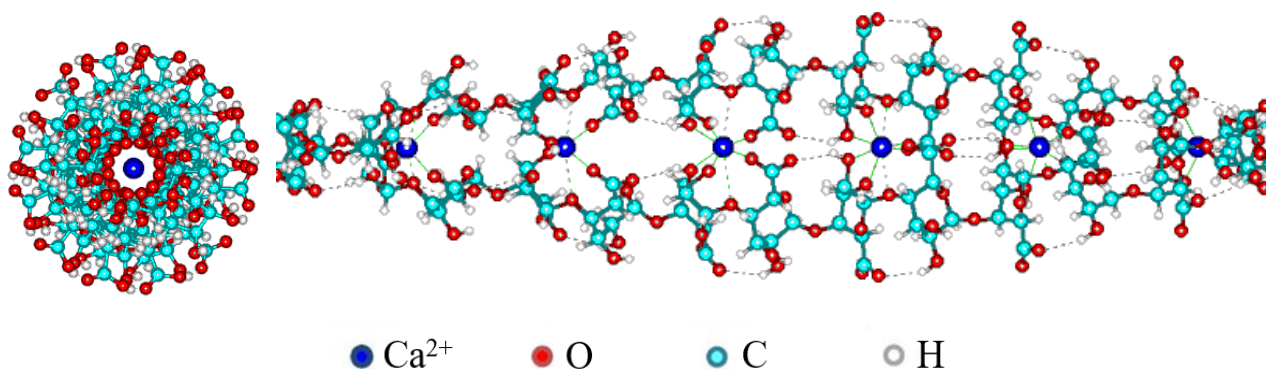
1.4.2.4.2. Mehanizam formiranja hidrogela

U prisustvu dvovalentnih ili viševalentnih katjona dolazi do interakcija između karboksilnih grupa alginata, što dovodi do formiranja gela. Smatra se da pretežno GG blokovi učestvuju u međumolekulskom umrežavanju jer njihova struktura omogućava visok stepen koordinacije dvovalentnih katjona. Naime, GG blokovi jednog polimernog lanca se preko dvovalentnih katjona vezuju za GG blokove susednog polimernog lanca, što dovodi do formiranja trodimenzionalne mreže (*Liu i sar., 2016*). Prilikom geliranja dvovalentnim katjonima, povezivanje sa alginatom se odvija planarno (dvodimenzionalno) (*Al-Musa i sar., 1999*). Ovakav mehanizam formiranja gela označava se kao model „kutije za jaja“ (engl. „egg-box model“, slika 1.17).



Slika 1.17. Formiranje alginatnog hidrogela po modelu „kutije za jaja“: jonske interakcije polianjonskih blokova alginata i divalentnih katjona (npr. Ca^{2+}) dovode do privlačenja susednih polimernih lanaca koji obrazuju međumolekulske veze i dolazi do formiranja hidrogela (prilagođeno iz *Martău i sar., 2019*).

Na slici 1.18 prikazana je struktura 3D modela Ca-poli- α -guluronata.



Slika 1.18. 3D model Ca-poli- α -guluronata: prikaz niz osu (levo) i prikaz duž ose (desno) (prilagođeno sa <https://water.lsbu.ac.uk/water/alginate.html>, pristupljeno 14.1.2025.)

U literaturi je predložen model po kome duži MG blokovi posredstvom Ca^{2+} jona takođe formiraju međumolekulske veze sa susednim GG i MG blokovima (*Donati i sar., 2005*). Kada dođe do zasićenja G ostataka jonima Ca^{2+} počinje njihovo vezivanje za COO^- grupe na M ostacima, pri čemu se formiraju slabe jonske veze (*Mitrović i sar., 2010*).

Alginatni hidrogelovi omogućavaju vezivanje i zadržavanje velike količine vode u svojoj trodimenzionalnoj strukturi zahvaljujući hidrofilnosti polimernih lanaca. Prilikom formiranja hidrogela dolazi do istiskivanja određene količine vode usled približavanja polimernih lanaca, pojave poznate pod nazivom *sinerezis*, što dovodi do povećanja koncentracije alginata u hidrogelu u odnosu na koncentraciju alginata u rastvoru pre geliranja (*Martinsen i sar., 1989*).

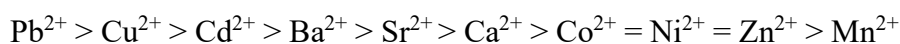
Fizičko-hemijske karakteristike alginatnog hidrogela zavise od molekulske težine i hemijskog sastava alginata, ali i od načina i gustine umrežavanja. Za jonsko umrežavanje alginata najčešće se koriste joni kalcijuma i ono može biti izvedeno kao unutrašnje i spoljašnje. Unutrašnje geliranje podrazumeva unošenje Ca^{2+} jona u neaktivnom obliku u rastvor alginata i naknadno kontrolisano oslobađanje ovih jona, što dovodi do formiranja hidrogela. Spoljašnje geliranje se zasniva na difuziji umrežavajućeg jona, Ca^{2+} , iz rastvora supstance koja sadrži Ca^{2+} jone u rastvor alginata. Spoljašnjim umrežavanjem dobijaju se hidrogelovi sa gradijentom koncentracije Ca^{2+} jona unutar hidrogela, dok unutrašnjim geliranjem nastaju hidrogelovi sa uniformnom koncentracijom jona po celoj zapremini (*Draget i sar., 1997*). Spoljašnje geliranje se najčešće izvodi istiskivanjem rastvora natrijum-alginata u rastvor kalcijum-hlorida (*Pawar i Edgar, 2012*) i ova metoda se može koristiti za dobijanje hidrogelova alginata u obliku čestica, vlakana i filmova. Ovaj način geliranja se koristi kada alginat služi kao matrica za imobilizaciju ćelija i biološki aktivnih agenasa zbog brzog i blagog geliranja kada kapi ili mlaz rastvora alginata sa agensom koji se imobilizuje dodirne rastvor za geliranje što vodi do obuhvatanja datog agensa alginatom (*Draget i sar., 1997*).

Kovalentno umrežavanje se intenzivno istraživalo sa ciljem da se poboljšaju fizičke karakteristike alginatnih hidrogelova u skladu sa različitim primenama, međutim, zbog moguće toksičnosti reaktanata za kovalentno umrežavanje, u biomedicinskoj primeni osnovni pristup za geliranje alginata je jonsko umrežavanje.

1.4.2.4.3. Stabilnost jonsko umreženih alginatnih hidrogelova

Osnovni nedostatak jonsko umreženih alginatnih hidrogelova je ograničena dugoročna stabilnost u fiziološkim uslovima. Ca-alginatni hidrogelovi su osetljivi na prisustvo helatnih jedinjenja poput fosfata, citrata i laktata, kao i antigelerajućih katjona kao što je Na^+ . U fiziološkom rastvoru dolazi do slabljenja Ca-alginatnog hidrogela usled izlaganja velikim koncentracijama jona Na^+ . Usled kompeticije između relativno male količine Ca^{2+} jona u hidrogelu i velike količine Na^+ jona u rastvoru dolazi do jonske izmene unutar alginatnog hidrogela, što rezultuje značajnim smanjenjem pritiska i smicajne čvrstoće (*LeRoux i sar., 1999*). Ispitivanje degradacije alginatnih mikročestica pokazalo je da se razgradnja hidrogelova Ca-alginata odvija prema sledećem mehanizmu: prvo dolazi do zamene jona kalcijuma vezanih za manuronske ostatke jonima natrijuma, što dovodi do slabljenja strukture hidrogela i bubrenja. U sledećoj, znatno sporijoj fazi, zamenjuju se i joni kalcijuma jače vezani za guluronske ostatke. U toj fazi dolazi do pucanja hidrogela i razgradnje na delove koji zaostaju u rastvoru (*Mitrović i sar., 2010*).

Stabilnost alginatnih hidrogelova može se postići zamenom Ca^{2+} jona drugim dvovalentnim ili trovalentnim katjonima koji imaju veći afinitet prema alginatu. Afinitet alginata prema dvovalentnim katjonima opada sledećim redosledom (*Smidsrød i Skja, 1990*):



Međutim, sa porastom afiniteta prema alginatu raste i krutost dobijenih hidrogelova. Takođe, neki od ovih jona su toksični (posebno Pb^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}) pa je njihova primena u biomedicinskom inženjerstvu strogo ograničena, a za istraživanja koja uključuju imobilizaciju živih ćelija isključivo se mogu koristiti Sr^{2+} i Ba^{2+} za stabilizaciju hidrogela (*Smidsrød i Skja, 1990*). Pokazano je da Ba^{2+} formira mehanički stabilnije i čvršće alginatne hidrogelove u poređenju sa Ca^{2+} , uz očuvanje biokompatibilnosti (*Li i sar., 2006; Mørch i sar., 2006*).

Dodatno, alginat formira jake komplekse sa polikatjonima kao što su hitozan i polipeptidi, kao i sa sintetičkim polimerima poput polietilamina. Ovi kompleksi se ne rastvaraju u prisustvu helirajućih agenasa ili antigelerajućih katjona, pa se mogu koristiti i za stabilizaciju hidrogela i za smanjenje poroznosti (*Smidsrød i Skja, 1990*).

1.4.2.4.4. Alginat kao nosač ćelija u 3D kulturama

Alginat se veoma često koristi za oponašanje vanćelijskog matriksa (Lee i Mooney, 2012) zahvaljujući velikoj biokompatibilnosti, netoksičnosti i odobrenoj medicinskoj upotrebi od strane Američke uprave za hranu i lekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration, FDA*). Dodatno, alginat gelira pri blagim uslovima u prisustvu dvovalentnih katjona poput Ca^{2+} , a alginatni hidrogelovi pružaju inertnu sredinu, pri čemu velika poroznost gela omogućava brzu difuziju makromolekula (Gombotz i Wee, 2012), čineći alginat pogodnim materijalom za 3D *in vitro* kulture ćelija (Andersen i sar., 2015). Još neke karakteristike koje čine alginat jednim od najčešće korišćenih polimera kako u inženjerstvu tkiva, tako i u inženjerstvu tumora, uključuju dostupnost i malu cenu, mogućnost brzog dobijanja hidrogela u velikim količinama, jednostavan proces rastvaranja kako bi se oslobodile ćelije, mehaničku i hemijsku stabilnost za ćelijsku kulturu, kao i transparentnost hidrogela, koja omogućava optičke analize (Li i sar., 2018).

Zahvaljujući navedenim svojstvima, alginat se široko primenjuje za dobijanje hidrogelova sa zadržanim ćelijama, uključujući različite vrste ćelija u inženjerstvu tkiva, kao što su matične ćelije (Khosravizadeh i sar., 2014; Olderøy i sar., 2014), hondrociti (Bittencourt i sar., 2009) i fibroblasti (Hunt i sar., 2010), ali i različite vrste malignih ćelija u inženjerstvu tumora, kao što su ćelije osteosarkoma (Grigore i sar., 2014), glioblastoma (Dragoj i sar., 2021) i karcinoma grlića materice (Stojkowska i sar., 2020). Dodatno, alginat je i jedan od najčešće korišćenih polimera u 3D bioštampanju, gde se primenjuje kao komponenta biomastila za bioštampanje različitih tipova ćelija. Na primer, biomastilo na bazi alginata i kolagena korišćeno je za bioštampanje matičnih ćelija (Yang i sar., 2018), dok je biomastilo na bazi alginata i želatina primenjeno za bioštampanje ćelija plućnog karcinoma (Wang i sar., 2018b).

1.4.3. Modeli zasnovani na uređajima

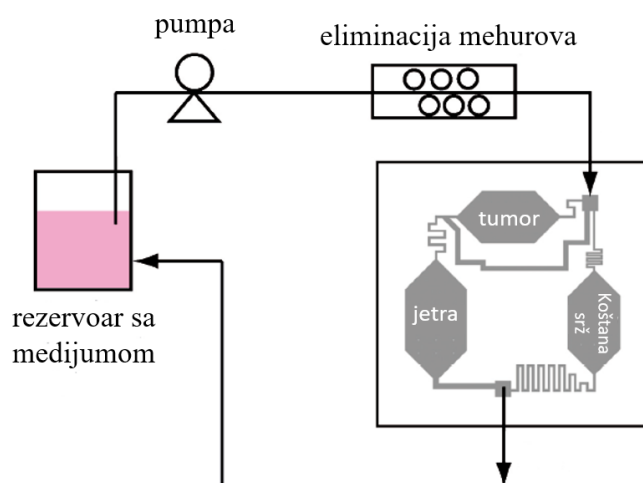
Modeli zasnovani na uređajima omogućavaju kontrolu uslova ćelijske kulture kroz uvođenje protoka i spoljašnjih fizičkih stimulusa. Za razliku od statičnih sistema, ovi pristupi omogućavaju oponašanje patofizioloških uslova, kao što su protok bioloških fluida i izlaganje ćelija relevantnim fizičkim signalima. U fiziološkim uslovima, krvni sudovi obezbeđuju dopremanje kiseonika, hranljivih materija i bioaktivnih molekula, kao i uklanjanje metaboličkih produkata, što je od suštinskog značaja za održavanje funkcionalnosti tkiva (Mei i sar., 2023). U statičnim 3D modelima, zbog difuzionih ograničenja, transport ovih komponenti je ograničen, što može dovesti do formiranja gradijenata i pojave hipoksičnih ili nekrotičnih zona (Mei i sar., 2023; Vella i sar., 2024). Uvođenjem protoka omogućava se efikasniji transport supstanci konvekcijom i bolja kontrola mikrookruženja. U zavisnosti od načina rada i kontrole uslova kulture, razvijeni su različiti tipovi uređaja, uključujući mikrofluidne sisteme i bioreaktore.

1.4.3.1. Mikrofluidni sistemi

Mikrofluidni uređaji predstavljaju sisteme koji se sastoje od komora u kojima se gaje ćelije i koje su međusobno povezane mikrokanalima. U ovim sistemima, tumorske ćelije mogu biti organizovane u 3D strukture na različite načine, uključujući sferoide i organoide (Dadgar i sar., 2020; Ao i sar., 2021), kao i zadržavanje u hidrogelovima (Sung i Shuler, 2009; Skardal i sar., 2016; Haque i sar., 2022), čime se obezbeđuje odgovarajuće trodimenzionalno mikrookruženje. Ovi uređaji omogućavaju preciznu kontrolu protoka malih zapremina fluida kroz mikrokanele, čime se obezbeđuje konstantno snabdevanje ćelija nutrijentima i kiseonikom. Precizna kontrola uslova kulture, uključujući brzinu proticanja medijuma i smicajni napon, omogućava ispitivanje ponašanja malignih ćelija u patofiziološki relevantnom mikrookruženju (Asghar i sar., 2015). U okviru ovih sistema razvijeni su modeli „organ-na-čipu“, koji imaju za cilj da oponašaju strukturu i funkciju specifičnih tkiva kroz kontrolisanu organizaciju ćelija i uslova okruženja. Na osnovu ovog pristupa dalje su razvijeni modeli „tumor-na-čipu“ i „metastaze-na-čipu“, namenjeni za proučavanje tumorskog mikrookruženja i progresije bolesti. Jedan od načina oponašanja mikrovaskulature u ovim

modelima je formiranje kanalića unutar hidrogelova sa inkapsuliranim ćelijama, kroz koje se omogućava kontrolisan protok medijuma. Dodatno, u model se mogu inkorporirati i endotelne ćelije, koje se zatim samoorganizuju u vaskularne mreže (Tsai i sar., 2017).

Za razliku od statičnih 3D modela, mikrofluidni sistemi omogućavaju veću kontrolu prostorne organizacije ćelija i povezivanje modela više različitih tkiva u jedinstven sistem putem mikrokanala. U jednoj studiji razvijen je model „tumor-na-čipu“ koji simulira međusobne interakcije više organa, kako bi se ispitao efekat antitumorskog leka na ćelije karcinoma debelog creva (Sung i Shuler, 2009). Model se sastojao iz tri zasebne komore u kojima su se, unutar hidrogelova (Matrigela ili alginata), odvojeno nalazile ćelije karcinoma debelog creva, ćelije hepatocelularnog karcinoma i mijeloblasti (nezrele ćelije u koštanoj srži iz kojih nastaju bela krvna zrnca), imitirajući maligni tumor debelog creva, jetru i koštanu srž, redom, a komore su bile povezane mikrofluidnim kanalima (slika 1.19). Ovakvi modeli omogućavaju proučavanje međusobnih interakcija različitih tkiva, kao i procese poput metabolizma i distribucije lekova i njihovog sistemskog dejstva. Pored toga, mikrofluidni sistemi omogućavaju uključivanje ćelija poreklom iz pacijenata, čime se formiraju personalizovani modeli tumora koji bolje imitiraju složenost mikrookruženja tumora i omogućavaju ispitivanje odgovora na terapiju u kontrolisanim uslovima (Haque i sar., 2022; Yi i sar., 2019). Posebnu primenu imaju modeli „metastaze-na-čipu“, u kojima su modeli različitih tkiva (malignog i zdravog) povezani protočnim sistemom, što omogućava praćenje migracije tumorskih ćelija između njih i proučavanje procesa metastaziranja u kontrolisanim uslovima (Skardal i sar., 2016).



Slika 1.19. Šematski prikaz modela „tumor-na-čipu“ korišćenog za proučavanje međusobnih interakcija ćelija karcinoma debelog creva, ćelija hepatocelularnog karcinoma i mijeloblasta (prilagođeno iz Sung i Shuler, 2009)

Ipak, uprkos brojnim prednostima, mikrofluidni sistemi imaju i određena ograničenja. I pored svoje složenosti, ovi modeli ne mogu u potpunosti da reprodukuju sve aspekte tumora *in vivo* (Ngo i sar., 2023). Naime, zbog ograničenih dimenzija mikrofluidnih uređaja, sferoidi, organoidi i imobilisane ćelije u ovim sistemima često obuhvataju relativno mali broj ćelija u poređenju sa tumorima *in vivo*. Dodatno, upravo njihova složenost, kao i potreba za specijalizovanom opremom i tehničkom ekspertizom, mogu otežati širu primenu (Johnson i sar., 2022).

1.4.3.2. Biomimični bioreaktorski sistemi

Biomimični bioreaktori predstavljaju sisteme za gajenje ćelija i tkiva koji omogućavaju dugotrajno održavanje 3D kultura uz kontrolisane uslove mikrookruženja, uključujući temperaturu, pH, osmolalitet, adekvatne koncentracije kiseonika, nutrijenata i bioaktivnih molekula, kao i efikasan prenos mase između medijuma i gajenih ćelija ili tkiva. Pored toga, ovi sistemi omogućavaju

izlaganje ćelija relevantnim fizičkim signalima, kao što su hidrodinamički naponi i mehanička stimulacija (*Freshney i sar., 2007; Avena i sar., 2025*).

1.4.3.2.1. Protočni bioreaktori

Protočni bioreaktori su najčešći tip bioreaktora korišćen za 3D *in vitro* kulture ćelija i tkiva. U njima se kontinuiranim protokom medijuma obezbeđuje dopremanje kiseonika, nutrijenata i drugih molekula do ćelija u 3D kulturi. U zavisnosti od dizajna sistema, medijum može direktno prolaziti kroz gajeni uzorak, strujati oko njega ili biti odvojen od uzorka membranom preko koje se odvija razmena supstanci (*Cavo i sar., 2018; Avena i sar., 2025*). Tipičan protočni sistem obuhvata pumpu, komoru sa uzorkom, rezervoar za medijum i povezani sistem creva (*Gaspar i sar., 2012*).

Protočni uslovi omogućavaju efikasniji prenos mase u odnosu na statične sisteme i na taj način smanjuju ograničenja difuzije i formiranje koncentracionih gradijenata unutar 3D modela, što je naročito važno kod većih ćelijskih agregata ili nosača ćelija gde transport difuzijom nije dovoljan za održavanje vijabilnosti ćelija u unutrašnjosti uzorka. Uvođenjem protočnih uslova obezbeđuje se konvektivni transport, čime se značajno unapređuje distribucija supstanci kroz čitavu zapreminu uzorka (*Freshney i sar., 2007*). U poređenju sa statičnim kulturama, protočni uslovi omogućavaju dugotrajnije održavanje 3D ćelijskih kultura i kultura eksplantata tumora, doprinoseći očuvanju vijabilnosti tumorskih ćelija (*Muraro i sar., 2017; Mei i sar., 2023*). U kontekstu ispitivanja antitumorskih lekova, protočni sistemi omogućavaju efikasniji transport lekova kroz 3D modele, čime se smanjuje uticaj difuzionih ograničenja na procenu njihovog efekta (*Mei i sar., 2023*).

Pored prenosa mase, protočni bioreaktori omogućavaju i kontrolu hidrodinamičkih uslova kojima su ćelije izložene. Hidrodinamičke karakteristike ovih sistema uključuju pre svega način proticanja medijuma kroz sistem i smicajni napon kome su izloženi zidovi nosača i ćelije. U većini sistema uspostavlja se laminaran tok, što omogućava stabilne i predvidljive uslove strujanja (*Grayson i sar., 2010; Guller i sar., 2016*). Brzina medijuma kroz komoru sa uzorkom može se podešavati u širokom opsegu, od manjih vrednosti ($15\text{--}40\ \mu\text{m s}^{-1}$) (*Banicevic i sar., 2025*) do većih brzina ($80\text{--}1800\ \mu\text{m s}^{-1}$) (*Grayson i sar., 2010*), što je posebno važno u modelima tumora, s obzirom na to da je brzina krvi u tumorskim krvnim sudovima veoma heterogena i može varirati u opsegu od približno $1\ \mu\text{m s}^{-1}$ do $10\ \text{mm s}^{-1}$ (*Jain i sar., 2014*). Dodatno, smicajni napon predstavlja važan mehanički faktor koji utiče na ponašanje ćelija, uključujući njihovu morfologiju, međućelijske interakcije, organizaciju i sastav vanćelijskog matriksa, kao i gensku ekspresiju (*Grayson i sar., 2010*). Pored toga, tok fluida može podstaći invazivnost tumorskih ćelija (*Munson i sar., 2013*).

Ipak, primena bioreaktora ima i određena ograničenja, uključujući probleme sa reproduktivnošću rezultata, dugotrajne procese validacije i ograničenu kompatibilnost sa pojedinim metodama snimanja (*Avena i sar., 2025*). Uprkos tome, ovi sistemi predstavljaju važnu komponentu u razvoju naprednih 3D modela tumora.

1.4.4. pristupi razvoju 3D *in vitro* modela osteosarkoma, glioma i karcinoma pluća

U ovom poglavlju prikazani su različiti pristupi razvoju 3D *in vitro* modela osteosarkoma, glioma i karcinoma pluća, uključujući modele zasnovane na ćelijama, biomaterijalima i uređajima.

1.4.4.1. Osteosarkom

Jedan od osnovnih ciljeva modela osteosarkoma jeste reprodukcija trodimenzionalne organizacije tumorskog tkiva i povećane rezistencije na lekove. U tom kontekstu, višćelijski sferoidi predstavljaju jedan od najčešće korišćenih modela, jer omogućavaju direktne međućelijske interakcije i formiranje gradijenata kiseonika i nutrijenata, što doprinosi većoj rezistenciji na hemioterapiju u poređenju sa ćelijama gajenim u monosloju (*Arai i sar., 2013; Rimann i sar., 2014; Gebhard i sar., 2016*). Hipoksični uslovi imaju važnu ulogu u modelima osteosarkoma jer mogu doprineti održavanju fenotipa matičnih ćelija osteosarkoma i očuvanju njihove pluripotentnosti i sposobnosti

samoobnavljanja (*Gorgun i sar., 2016*). Dodatno, uključivanje stromalnih ćelija, poput mezenhimalnih matičnih ćelija, u modele zasnovane na sferoidima omogućava imitaciju interakcija između tumora i mikrokruženja i oponašanje različitih faza progresije bolesti, uključujući razvoj stečene rezistencije na hemioterapiju (*Freeman i sar., 2022*).

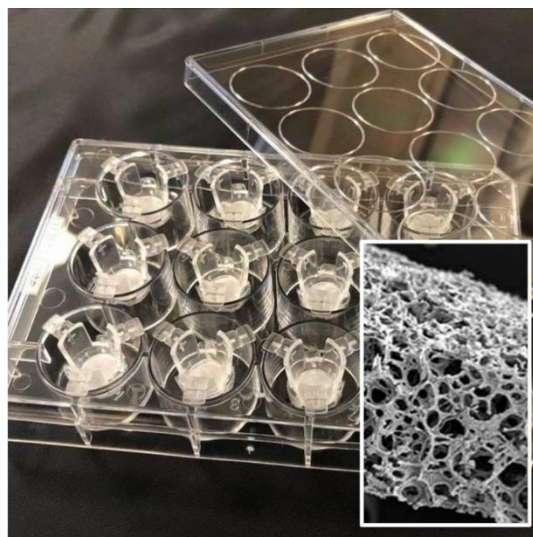
Uključivanje nosača, pored trodimenzionalne organizacije ćelija, može doprineti relevantnijem odgovoru ćelija na lekove od onih gajenih u 2D kulturama (*Monteiro i sar., 2021; Tornin i sar., 2021; Lin i sar., 2022*). Zbog toga se u razvoju ovih modela često koriste nosači koji imitiraju organsku i neorgansku komponentu vanćelijskog matriksa kosti kako bi se što vernije oponašalo mikrokruženje koštanog tkiva. Za imitaciju organske faze primenjuju se različiti prirodni i sintetički polimeri, dok se za imitaciju mineralizovane komponente najčešće koriste hidroksiapatit, trikalcijum-fosfat i bioaktivno staklo (*Gerhardt i Boccaccini, 2010; Samavedi i sar., 2013*). Prisustvo mineralne faze, poput hidroksiapatita, ima ključnu ulogu u održavanju signalnih puteva karakterističnih za osteosarkom, kao i u reprodukciji rezistencije na lekove slične onoj uočenoj *in vivo* (*González Díaz i sar., 2022*). Pored sastava, nosač bi trebalo da verno oponaša i anatomsku strukturu kako bi se što uspešnije imitirala prirodna kost. S obzirom da je vanćelijski matriks kosti porozna, trodimenzionalna struktura, često se koriste porozni nosači koji omogućavaju rast i organizaciju ćelija u trodimenzionalnom okruženju (*Contessi Negrini i sar., 2022; Wang i sar., 2022*). Pokazano je da porozni nosači na bazi kolagena i hidroksiapatita podstiču proliferaciju i migraciju ćelija osteosarkoma, očuvanje fenotipa tumorskih matičnih ćelija i aktivaciju signalnih puteva povezanih sa progresijom tumora (*Bassi i sar., 2020; Tornin i sar., 2021*). Bioštampanjem ćelija osteosarkoma u biomaterijalima na bazi želatina, hijaluronske kiseline ili kolagena moguće je formirati 3D sisteme definisane arhitekture koji podržavaju proliferaciju, migraciju i održavanje agresivnijeg fenotipa tumorskih ćelija (*Lin i sar., 2022; Pellegrini i sar., 2022*).

Uključivanje protočnih uslova u 3D modelima osteosarkoma omogućava oponašanje mikrokruženja tumora, uključujući transport kiseonika, nutrijenata i lekova kontinuiranim protokom medijuma. Ovakvi uslovi mogu doprineti povećanoj metaboličkoj aktivnosti ćelija u odnosu na statične kulture, dok izlaganje ćelija smicajnim naponima može podstaći rast i agresivnost osteosarkoma (*Jaiswal i sar., 2025; Menshikh i sar., 2025*). Dodatno, efikasniji transport lekova u protočnim uslovima može pokazati povećanu osetljivost ćelija u odnosu na statične kulture (*Jaiswal i sar., 2025*), što ukazuje na ulogu difuzionih ograničenja u testiranju lekova u 3D modelima određenih dimenzija i sastava.

1.4.4.2. Gliom

Karakteristika 3D *in vitro* modela glioma je to što često uključuju hijaluronsku kiselinu, jer ona predstavlja jednu od ključnih komponenti vanćelijskog matriksa mozga, a lokalne promene koncentracije često su povezane sa napredovanjem glioma. Pri tome, maligni tumori sadrže više hijaluronske kiseline u poređenju sa normalnim moždanim tkivom. U 3D modelima glioma, prisustvo hijaluronske kiseline može dovesti do značajnih promena u ekspresiji gena koji kodiraju markere za gliom i podstaći formiranje ćelijskih agregata (*Pedron i sar., 2013*). Takođe, pokazano je da gajenje ćelija glioma na nosaču na bazi hijaluronske kiseline i hitozana može doprineti povećanju invazivnosti i rezistencije na hemioterapiju u odnosu na 2D kulture (*Florczyk i sar., 2013*).

Komercijalno dostupni Alvetex™ porozni nosač na bazi polistirena (slika 1.20) omogućava ćelijama glioblastoma da oponašaju ključne histološke karakteristike tumora. Model glioblastoma zasnovan na ovom nosaču omogućio je predviđanje kliničke efikasnosti tri ispitivana antitumorska leka, što je ukazalo na njegovu kliničku relevantnost i potencijal za pretkliničku evaluaciju lekova (*Gomez-Roman i sar., 2017*).



Slika 1.20. Komercijalno dostupni Alvetex™ 3D nosač (izvor: *Reprocell*, 2025, <https://www.reprocell.com/product-catalog/alvetex-3d-cell-culture-systems>)

Gliom, pored tumorskih ćelija, sadrži i populaciju samoobnavljajućih matičnih ćelija, koje imaju važnu ulogu u progresiji bolesti, terapijskoj rezistenciji i rekurenciji tumora, zbog čega modeli koji omogućavaju očuvanje fenotipa ovih ćelija imaju poseban značaj. Pokazano je da nosači na bazi hidrogela alginata, želatina i fibrinogena mogu doprineti očuvanju karakteristika matičnih ćelija glioma, povećanoj ekspresiji gena povezanih sa angiogenezom i progresijom tumora, kao i većoj otpornosti na hemioterapiju u poređenju sa 2D kulturama (*Dai i sar.*, 2016; *Wang i sar.*, 2018a). Takođe, sferoidi matičnih ćelija glioma, tzv. gliomasfere, predstavljaju značajne modele za brzo testiranje velikog broja lekova (*Li i sar.*, 2017).

Za progresiju glioma značajne su i interakcije tumorskih ćelija sa drugim ćelijama nervnog tkiva. Pokazano je da u kokulturama neurona i ćelija glioma u 3D modelima neuroni mogu uticati na proliferaciju, morfologiju i signalizaciju tumorskih ćelija, dok istovremeno ćelije glioma mogu uticati na vijabilnost i morfološke karakteristike neurona (*Bai i sar.*, 2023).

Za imitiranje hipoksičnih zona karakterističnih za glioblastom mogu se koristiti 3D modeli zasnovani na sferoidima i hidrogelovima, u kojima je ograničen transport kiseonika kroz trodimenzionalnu strukturu. Pokazano je da hidrogelovi na bazi alginata i želatina mogu podržati formiranje heterogene organizacije ćelija u prethodno formiranim sferoidima imobilisanim u hidrogelu, sa proliferativnim, hipoksičnim i nekrotičnim zonama, uz povećanu ekspresiju markera povezanih sa hipoksijom (*del Rocío Aguilera-Marquez i sar.*, 2025). Dodatno, 3D i hipoksični uslovi mogu doprineti povećanoj rezistenciji ćelija glioma na terapiju i očuvanju agresivnijeg fenotipa ćelija (*Kim i sar.*, 2011).

Hidrodinamički uslovi takođe imaju važnu ulogu u modelovanju glioma. Intersticijalni protok može uticati na migraciju i invazivnost ćelija glioma, pri čemu je pokazano da ćelije migriraju u smeru protoka fluida kroz hidrogel u kojem su imobilisane (*Munson i sar.*, 2013). Takođe, mikrofluidni modeli „glioblastom-na-čipu“, koji obezbeđuju kontrolisan protok medijuma, mogu značajno produžiti trajanje 3D kulture (do 70 dana), omogućavajući ispitivanje dugoročnih efekata hemioterapije na ćelije glioma. U ovim modelima pokazano je da deo ćelija može preživeti tretman i razviti invazivniji fenotip, što odgovara terapijskoj rezistenciji uočenoj kod pacijenata (*Ozturk i sar.*, 2020).

1.4.4.3. Karcinom pluća

U modelima karcinoma pluća se za reprodukciju heterogene organizacije tumora i hipoksičnih zona, slično kao i kod osteosarkoma i glioma, često koriste sferoidi (*Modi i sar.*, 2022). Kombinovanje sferoida sa hidrogelovima ili drugim nosačima dodatno povećava patofiziološku relevantnost modela, jer omogućava istovremeno oponašanje prostorne organizacije tumora i interakcija ćelija sa

vanćelijskim matriksom. Pokazano je da hidrogelovi na bazi dekstrana, hitozana ili decelularizovanog vanćelijskog matriksa mogu podržati formiranje sferoida sa izraženim invazivnim potencijalom, aktivacijom signalnih puteva povezanih sa hipoksijom i relevantnijim odgovorom na terapiju u poređenju sa 2D kulturama (*Modi i sar., 2022; Shie i sar., 2023*). U pojedinim modelima dodatno je oponašana angiogeneza kokulturom sa endotelnim ćelijama, pri čemu je formirana vaskularna mreža usmerena ka tumorskim sferoidima (*Shie i sar., 2023*).

Za reprodukciju interakcija ćelija sa vanćelijskim matriksom i mehaničkih karakteristika pluća koriste se modeli zasnovani na hidrogelovima i poroznim nosačima. Najčešće korišćeni materijali uključuju alginat, želatin, fibrinogen, poliuretan i decelularizovani vanćelijski matriks. Pokazano je da ovakvi modeli mogu reprodukovati mehanička svojstva i strukturu pluća, podržati formiranje sferoida i podstaći ekspresiju gena povezanih sa invazivnošću (*Wang i sar., 2018b; Sun i sar., 2023*). U poređenju sa 2D kulturama, ćelije gajene u ovim modelima često pokazuju veću otpornost na terapiju i proteinske profile sličnije tumorima *in vivo*. U ovu grupu spadaju i komercijalno dostupni sistemi, kao što su *AlgiMatrix™*, porozni alginatni sunder sa definisanom veličinom pora, i *VitroGel*, polisaharidni hidrogel, koji omogućavaju standardizovano formiranje sferoida i reprodukovanje povećane rezistencije ćelija plućnog karcinoma na antitumorske lekove u 3D uslovima (*Godugu i sar., 2013; Gebeyehu i sar., 2021*).

Modeli „pluća-na-čipu“, omogućavaju simulaciju veoma malih smicajnih napona prisutnih u plućnoj mikrovaskulaturi, kao i proučavanje transporta i difuzije lekova kroz biološke barijere (*Li i sar., 2020*). Pokazano je da ovakvi sistemi mogu reprodukovati promene osetljivosti ćelija na terapiju u zavisnosti od uslova mikrookruženja, uključujući razvoj rezistencije na lekove indukovane hipoksijom (*Li i sar., 2020*). Zbog mogućnosti integracije više biohemijskih i biofizičkih faktora, modeli „pluća-na-čipu“ imaju značajan potencijal za proučavanje biologije karcinoma pluća i razvoj relevantnijih platformi za prekliničko ispitivanje terapija (*Francis i sar., 2022; Zhu i sar., 2023*).

1.4.4.4. Potencijal i ograničenja 3D *in vitro* modela malignih tumora

Uprkos značajnom napretku u razvoju 3D *in vitro* modela malignih tumora, potpuna reprodukcija složenosti *in vivo* tumorskog mikrookruženja i dalje predstavlja veliki izazov. Savremeni modeli omogućavaju uspešno oponašanje pojedinih karakteristika tumora, uključujući hipoksiju, interakcije ćelija sa vanćelijskim matriksom i netumorskim ćelijama, heterogenost ćelijskih populacija i protočne uslove transporta. Međutim, i dalje postoje ograničenja povezana sa reprodukcijom vaskularizacije, imunskog mikrookruženja, dugoročnim održavanjem kompleksnih kokultura, kao i standardizacijom i ponovljivošću biomimetičnih sistema. Dodatni izazov predstavlja balans između kompleksnosti modela i njihove praktične primene u ispitivanju lekova. Uprkos tome, savremeni 3D modeli predstavljaju značajan alat za proučavanje biologije tumora, mehanizama rezistencije na terapiju, testiranja antitumorskih lekova i razvoj personalizovanih terapijskih pristupa.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji je bio razvoj i validacija jednostavnog i relevantnog biomimetičnog 3D modela za gajenje malignih ćelija, zasnovanog na alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim ćelijama i protočnom bioreктору, za potencijalnu primenu u istraživanju malignih tumora i pretkliničkom testiranju antitumorskih lekova.

Istraživanja su uključivala nekoliko celina:

1. određivanje optimalnih parametara za dobijanje alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim različitim tipovima malignih ćelija metodom ručnog istiskivanja;
2. ispitivanje mogućnosti gajenja imobilisanih malignih ćelija u alginatnim mikrovlaknima u protočnom bioreктору;
3. validaciju razvijenog 3D modela kroz kratkotrajno i dugotrajno gajenje malignih ćelija imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima na osnovu ispitivanja ponašanja ćelija tokom gajenja;
4. ispitivanje mogućnosti primene razvijenog 3D modela za pretkliničko testiranje antitumorskih lekova.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Materijali korišćeni tokom eksperimenata u ovom radu su: Na-alginat male viskoznosti (A3249, *Applichem*, Nemačka), dve šarže bagremovog meda od različitih proizvođača (Aza d.o.o., Srbija i Venenum Apis, Srbija), hidroksiapatit (čestice 2,5 μm , specifična površina $\geq 80 \text{ g m}^{-2}$, *Sigma-Aldrich*, Nemačka), kalcijum hlorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NRK Inženjering, Srbija i *Acros Organics*, SAD), kalcijum nitrat tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, *Sigma-Aldrich*, Austrija), barijum hlorid dihidrat ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Alkaloid, Severna Makedonija), natrijum citrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, *Sigma-Aldrich*, Austrija), srebro nitrat (AgNO_3 , Pliva, Hrvatska), natrijum hidroksid (NaOH , *Sigma-Aldrich*, SAD), dinatrijum so etilendiamin tetrasirćetne kiseline dihidrat ($\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, *HiMedia*, Indija), ćelijski medijum *Dublecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) sa velikom koncentracijom glukoze (4,5 g dm^{-3} glukoza, *Biological Industries*, Izrael i *EuroClone*, Italija), *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)1640 ćelijski medijum (*Capricorn Scientific*, Nemačka), goveđi fetalni serum (*Fetal Bovine Serum* – FBS, *Biological Industries*, Izrael, *Sigma-Aldrich*, Nemačka i *EuroClone*, Italija), penicilin-streptomycin-amfotericin B rastvor (pen-strep-amfo. B, *Biological Industries*, Izrael), penicilin-streptomycin rastvor (*GibcoTM*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD i *Merck*, Nemačka), amfotericin B rastvor (*GibcoTM*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD), L-glutamin (*GibcoTM*, *Thermo Fisher Scientific*, SAD, *Sigma-Aldrich*, Austrija, *Sigma-Aldrich*, Nemačka i *Merck*, Nemačka), rastvor 0,25 % tripsin/etilendiamin tetrasirćetne kiseline (trypsin/EDTA, *Sigma-Aldrich*, Nemačka), $10\times$ tripsin/EDTA (*Sigma-Aldrich*, SAD), fosfatni puferisani rastvor (engl. *phosphate-buffered saline* – PBS, *Sigma-Aldrich*, SAD), boja tripan plavo (*Sigma-Aldrich*, SAD), 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid (MTT, *Merck & Co., Inc.*, SAD i *Sigma-Aldrich*, Nemačka), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, *Sigma-Aldrich*, SAD), kalcein AM (CAM, *Tocris Bioscience*, UK i *Dojindo*, Nemačka), propidijum jodid (PI, *Sigma-Aldrich*, Nemačka i *Thermo Fisher Scientific*, SAD), hematoksilin-eozin boja (H&E, *BioGnost*, Hrvatska), komplet za kontrasto bojenje retikulinskih vlakana (*BioGnost*, Hrvatska), formaldehid (Centrohem, Srbija), neutralno-puferisan rastvor formaldehida (*BioGnost*, Hrvatska), dimetil sulfoksid (DMSO, *Fisher Scientific*, UK), TRIzol reagens (*Invitrogen*, SAD), mišja antitubulinska antitela (ab56676, *Abcam*, SAD), rastvarač za antitela OP Quanto (TA-125-ADQ, *Thermo Scientific*, SAD), *Power SYBR Green PCR Master Mix* reagens (*Applied Biosystems*, SAD), *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* reagens (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), sekundarna antitela *Alexa Fluor 594* kozja anti-mišja IgG (H+L, A-11032, *Invitrogen*, SAD), doksorubicin (*Ebewe*, Austrija), cisplatin (*Sigma-Aldrich*, Nemačka), etopozid (*Sigma-Aldrich*, Nemačka) i vinorelbin (*Selleckchem*, SAD).

3.2. Ćelijske linije i ćelijska kultura

U ovom radu korišćene su sledeće ćelijske linije: ćelijska linija glioma pacova C6 (ATCC[®] CCL-107TM), ćelijska linija humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 (ATCC[®] HTB-177TM), i ćelijska linija mišjeg osteosarkoma K7M2-wt (ATCC[®] CRL-2836TM), nabavljene od *American Type Culture Collection* (ATCC, SAD), kao i dve ćelijske linije humanog osteosarkoma, HOS (HTL04003) i U2OS (HTL11001), nabavljene od *Biological Resource Center CLC Cell bank* (Italija). Ćelijske linije C6, K7M2-wt, HOS i U2OS gajene su u Petrijevim šoljama za ćelijsku kulturu površine 58 cm^2 ili u flaskovima za ćelijsku kulturu površine 75 cm^2 i 175 cm^2 , u kompletnom DMEM medijumu (cDMEM – DMEM sa 10 % FBS, 2 mM L-glutamina i 1% pen-strep-amfo. B rastvora), dok je ćelijska linija NCI-H460 gajena u flaskovima za ćelijsku kulturu površine 75 cm^2 , u kompletnom RPMI 1640 medijumu (RPMI medijum sa 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 4,5 g dm^{-3} glukoze, 10000 U cm^{-3} penicilina, 10 mg cm^{-3} streptomicina i 25 $\mu\text{g cm}^{-3}$ amfotericin B rastvora). Ćelije su presejavane korišćenjem 0,25 % Tripsin/EDTA rastvora ili $1\times$ Tripsin/EDTA rastvora na sledeći način. Kada su ćelije postale 80-90 % konfluentne, medijum je odstranjen i posude su isprane 2 puta sa PBS, a zatim je dodat Tripsin/EDTA rastvor tako da prekrije dno posude. nakon inkubacije

ćelija sa Trypsin/EDTA rastvorom 5-10 min na 37 °C kako bi se ćelije odlepile, dodata je najmanje 2 puta veća zapremina medijuma kako bi se zaustavilo delovanje tripsina. Ćelije su zatim prebačene u odgovarajuće posude za gajenje ćelija u gustini od 5×10^3 ćelija cm^{-2} .

3.3. Dobijanje alginatnih mikrovlakana

3.3.1. Dobijanje alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama

Imobilizacija ćelija u alginatna mikrovlakna vršena je ručnim istiskivanjem suspenzije ćelija u Na-alginatu u rastvor za geliranje. Ukratko, prah Na-alginata rastvoren je u destilovanoj vodi kako bi se dobio rastvor alginata željene koncentracije (2–3,5 mas. %). Rastvor je zatim sterilisan ključanjem uz mešanje na magnetnoj mešalici 30 min. Ohlađeni, sterilni rastvor se stavi u špric i doda se ćelijska suspenzija tako da finalna koncentracija ćelija bude $2-8 \times 10^6$ ćel cm^{-3} , a Na-alginata 1,6–2,8 mas. %. Zatim se suspenzija ćelija u rastvoru Na-alginata ručno istiskuje u rastvor za geliranje kroz iglu (22–26 G), pri čemu je vrh igle uronjen u rastvor za geliranje tokom celokupnog vremena istiskivanja. Za svaki skup eksperimentalnih uslova održavana je približno ista srednja brzina istiskivanja kako bi se dobila vlakna uniformnog prečnika (slika 3.1).



Slika 3.1. Šema dobijanja mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama pomoću šprica i igle, ručnim istiskivanjem suspenzije ćelija u Na-alginatu u rastvor za geliranje

3.3.1.1. Imobilizacija C6 ćelijske linije u Ca-alginatna mikrovlakna

Suspenzija C6 ćelijske linije u alginatnom rastvoru ($2-8 \times 10^6$ ćel cm^{-3} , 2,8 mas. % Na-alginat) istiskivana je kroz čeličnu iglu sa ravnim vrhom veličine 25 G (unutrašnji prečnik 0,26 mm; *Small Parts Inc.*, SAD) u rastvor za geliranje koji je sadržao 180 mM Ca^{2+} (4,32 mas. % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Nakon 15 minuta u rastvoru za geliranje mikrovlakna su isprana u medijumu DMEM, prebačena u kompletan medijum cDMEM i gajena u statičnim ili protočnim uslovima.

3.3.1.2. Imobilizacija HOS i U2OS ćelijskih linija u Ca-alginatna mikrovlakna

Suspenzije HOS i U2OS ćelijskih linija u alginatnom rastvoru (4×10^6 ćel cm^{-3} , 2–2,8 mas. % Na-alginat) istiskivane su kroz čeličnu iglu sa ravnim vrhom veličine 25 G u rastvor za geliranje koji je sadržao 180 mM Ca^{2+} (2,65 mas. % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Nakon 15 minuta u rastvoru za geliranje mikrovlakna su isprana u medijumu DMEM, prebačena u kompletan medijum cDMEM i gajena u statičnim uslovima.

3.3.1.2.1. Imobilizacija HOS sferoida u Ca-alginatna mikrovlakna

Sferoidi HOS ćelijske linije dobijeni su zasejavanjem 5×10^3 ćelija po bunariću posude sa 96 bunarića sa ultra-malim vezivanjem (*PrimeSurface®96U ultra-low attachment plate S-BIO*, SAD), u 100 mm^3

medijuma cDMEM po bunariću. Nakon 4 dana, formirani sferoidi imobilisani su u Ca-alginatna mikrovlakna na sledeći način. Suspenzija 90 sferoida u 0,5 cm³ Na-alginata (2,8 mas. %) istiskivana je kroz čeličnu iglu sa ravnim vrhom veličine 25 G u rastvor za geliranje koji je sadržao 180 mM Ca²⁺ (2,65 mas. % CaCl₂·2H₂O). Nakon 15 minuta u rastvoru za geliranje mikrovlakna su isprana u medijumu DMEM, prebačena u kompletan medijum cDMEM i gajena u statičnim uslovima.

3.3.1.3. Imobilizacija K7M2-wt ćelijske linije u Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakna

Napravljena su 2 rastvora: Na-alginatni i HAP/Na-alginatni. Kako bi se napravio HAP/Na-alginatni rastvor, prah HAP je sterilisan na 180°C tokom 1 h, nakon čega je rastvoren u sterilnoj destilovanoj vodi, a zatim dodat u rastvor Na-alginata, tako da u finalnoj suspenziji sa ćelijama i koncentracija Na-alginata i koncentracija HAP budu 2 mas. %. Zatim su suspenzije K7M2-wt ćelijske linije u oba dobijena rastvora (Na-alginatnom: 4×10⁶ ćel cm⁻³, 2 mas. % Na-alginat, i HAP/Na-alginatnom: 4×10⁶ ćel cm⁻³, 2 mas. % Na-alginat, 2 mas. % HAP) istiskivane kroz iglu sa kosim vrhom za jednokratnu upotrebu veličine 26 G (unutrašnji prečnik 0,24 mm, *Nipro Medical*, Srbija) u rastvor za geliranje koji je sadržao 180 mM Ca²⁺ (2,65 mas. % CaCl₂·2H₂O). Nakon 15 minuta u rastvoru za geliranje mikrovlakna su isprana u medijumu DMEM, prebačena u kompletan medijum cDMEM i gajena u statičnim uslovima.

3.3.1.4. Imobilizacija NCI-H460 ćelijske linije u Ca-alginatna i Ba-alginatna mikrovlakna

Napravljena su 2 tipa mikrovlakana sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama: Ca-alginatna i Ba-alginatna, pri čemu je korišćena ista metoda, a razlikovao se rastvor za geliranje. U prvom slučaju, suspenzija NCI-H460 ćelijske linije u alginatnom rastvoru (4×10⁶ ćel cm⁻³, 2,8 mas. % Na-alginat) istiskivana je kroz čeličnu iglu sa ravnim vrhom veličine 25 G u rastvor za geliranje koji je sadržao 180 mM Ca²⁺ (4,32 mas. % Ca(NO₃)₂·4H₂O). Nakon 15 minuta u rastvoru za geliranje mikrovlakna su isprana u medijumu RPMI, prebačena u kompletan medijum RPMI i gajena u statičnim uslovima. U drugom slučaju, suspenzija NCI-H460 ćelijske linije u alginatnom rastvoru (4×10⁶ ćel cm⁻³, 1,6–2,8 mas. % Na-alginat) istiskivana je na isti način u rastvor za geliranje koji je sadržao 45–180 mM Ba²⁺ (0,94–3,75 mas. % BaCl₂·2H₂O), pri čemu su primenjene 2 brzine istiskivanja: umereno i brzo, a varirano je i vreme geliranja: 1 i 15 min. Mikrovlakna su zatim na isti način isprana i gajena u statičnim ili protočnim uslovima.

3.3.2. Dobijanje kontrolnih Ca-alginatnih mikrovlakana bez ćelija

Kontrolna Ca-alginatna mikrovlakna dobijena su ručnim istiskivanjem 2,8 mas. % Na-alginata koji je sadržao 20 % medijuma DMEM ili medijuma RPMI (kao zamena za ćelijsku suspenziju) kroz čeličnu iglu sa ravnim vrhom veličine 25 G u rastvor za geliranje koji je sadržao 180 mM Ca²⁺ (4,32 mas. % Ca(NO₃)₂·4H₂O). Geliranje je trajalo 15 min, nakon čega su dobijena mikrovlakna isprana, a zatim gajena 7 dana u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO₂ u odgovarajućem medijumu (1–1,5 g u 15 cm³).

Za ispitivanje brzine istiskivanja, eksperimentalno su mereni protoci rastvora 2 mas. % Na-alginata istiskivanog kroz igle sa ravnim vrhom 2 veličine: 25 G (unutrašnji prečnik 0,26 mm) i 22 G (unutrašnji prečnik 0,41 mm) i pri 2 brzine istiskivanja: umereno i brzo.

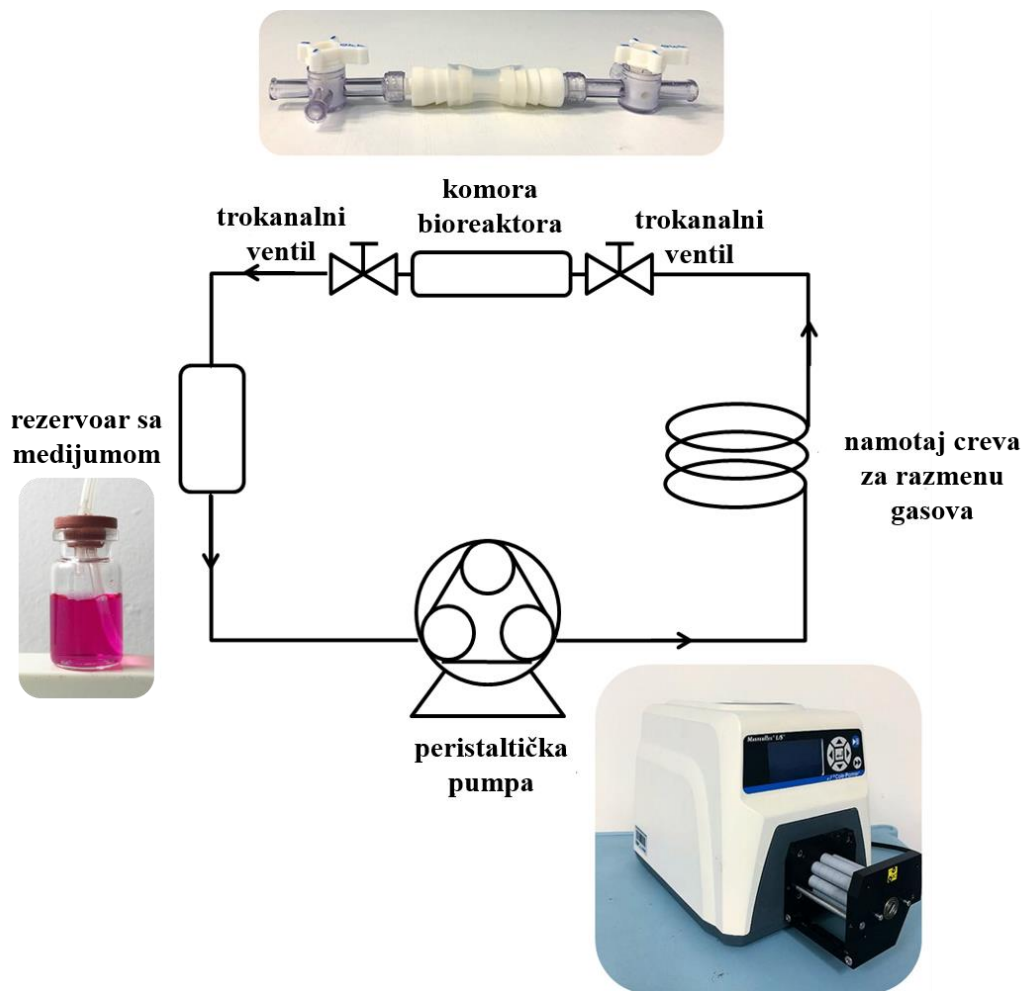
3.4. Gajenje imobilisanih ćelija u statičnim uslovima

Nakon imobilizacije, mikrovlakna sa imobilisanim ćelijama gajena su u Petrijevim šoljama površine 58 cm² (ćelijska linija C6) ili u T-25 flaskovima površine 25 cm² (ćelijske linije HOS, U2OS, K7M2-wt i NCI-H460) (0,5 g mikrovlakana u 15 cm³ medijuma) u statičnim uslovima, u inkubatoru sa zasićenim vlažnim vazduhom i 5 % CO₂ na temperaturi od 37 °C. Imobilisane NCI-H460 ćelije gajene su do 7 dana, imobilisane U2OS ćelije do 11 dana, imobilisani HOS sferoidi do 12 dana, a imobilisane HOS i K7M2-wt ćelije do 21 dana. Dva puta nedeljno je 40 % medijuma menjano svežim medijumom.

Za histopatološku analizu, 0,2-0,3 g (u triplikatu) Ca-alginatnih i HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama uzorkovano je 1., 7., 14. i 21. dana gajenja. Za određivanje veličine ćelijskih agregata K7M2-wt ćelija u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima korišćeno je po najmanje 6 histoloških preseka oba tipa mikrovlakana 7. i 21. dana, pri čemu je svaki histološki presek sadržao najmanje 20 različitih delova mikrovlakana. Za imunofluorescentnu citohemijsku analizu Ca-alginatnih i HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama korišćena su po 2 histološka preseka oba tipa mikrovlakana 1., 7., 14. i 21. dana. Za MTT test uzorkovano je po 3 uzorka dužine 3 cm Ca-alginatnih i HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama 1., 7., 14. i 21. dana. Eksperiment je izveden u 4 replikata. Za *Live/Dead* esej ćelija imobilisanih u Ca-alginatnim mikrovlaknima korišćen je po 1 cm mikrovlakana u sledećim vremenskim tačkama. Mikrovlakna sa imobilisanim HOS ćelijama uzorkovana su nakon 1., 4., 11. i 21. dana gajenja, mikrovlakna sa imobilisanim U2OS ćelijama nakon 1., 5. i 11. dana gajenja, dok su mikrovlakna sa imobilisanim HOS sferoidima uzorkovana nakon 2. i 12. dana gajenja. Eksperimenti su ponovljeni najmanje 3 puta. Za *Live/Dead* esej NCI-H460 ćelija imobilisanih u Ba-alginatnim mikrovlaknima korišćeno je po 1-2 cm mikrovlakana uzorkovanih nakon 1., 4. i 7. dana gajenja (u duplikatu). Eksperiment je ponovljen 4 puta.

3.5. Gajenje imobilisanih ćelija u protočnom bioreктору

Za gajenje C6 ćelija imobilisanih u Ca-alginatnim mikrovlaknima dobijenim ručnim istiskivanjem ćelijske suspenzije sa 2,8 mas. % Na-alginata i 4×10^6 ćel cm^{-3} , kao i NCI-H460 ćelija imobilisanih u Ba-alginatnim mikrovlaknima dobijenim ručnim istiskivanjem ćelijske suspenzije sa 1,6–2 mas. % Na-alginata i 4×10^6 ćel cm^{-3}) u uslovima kontinualnog protoka korišćen je protočni bioreaktor za jednokratnu upotrebu (*3D Perfuse*, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, Srbija). Bioreaktorski sistem sastoji se od komore, rezervoara za medijum i sistema creva za recirkulaciju medijuma (slika 3.2). Komora bioreaktora sastoji se iz dva dela izrađena od poliamida sa perforiranim površinama kako bi se omogućio ravnomeran protok medijuma kroz uzorak. Ova dva dela komore predstavljaju ulaz i izlaz i spajaju se silikonskim crevom (95802-15, *Cole-Parmer*, SAD) tako da obrazuju komoru u koju se smeštaju mikrovlakna. Unutrašnji prečnik komore bioreaktora iznosio je 0,8 cm, a visina komore u svim eksperimentima je iznosila 4 cm. Na ulazu i izlazu iz komore nalaze se trokraki ventili, odnosno slavine, na koje se postavlja po jedan špric, kako bi se omogućilo dodavanje medijuma u sistem, zamena medijuma i izbacivanje neželjenih mehurova gasa iz komore. Sistem creva za recirkulaciju medijuma (silikonska creva očvrsnuta platinskim katalizatorom – „platinum-cured“) sadrži i crevo za razmenu gasova. Kontinualni protok medijuma ostvaruje se pomoću višekanalne peristaltičke pumpe (*Masterflex*, SAD), pri čemu medijum protiče direktno kroz pakovani sloj mikrovlakana.



Slika 3.2. Šematski prikaz protočnog bioreaktorskog sistema sa fotografijama komore bioreaktora, rezervoara za medijum i višekanalne peristaltičke pumpe

Ispitana su 2 režima gajenja imobilisanih C6 ćelija u mikrovlaknima u protočnom bioreaktorskom sistemu: 1) nakon imobilizacije u Ca-alginatna mikrovlakna, ćelije su gajene u statičkim uslovima 24 h, a zatim još 5 dana u uslovima kontinualnog protoka (prva eksperimentalna serija), i 2) nakon imobilizacije u Ca-alginatna mikrovlakna, ćelije su gajene 8 dana u statičkim uslovima, a zatim još 5 dana u uslovima kontinualnog protoka (druga eksperimentalna serija). Imobilisane NCI-H460 ćelije u mikrovlaknima gajene su 24 h u statičnim uslovima, a zatim još 3 dana u uslovima kontinualnog protoka. Eksperimenti u bioreaktorskom sistemu izvedeni su na sledeći način: u komoru bioreaktora smeštano je po 0,5 g mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama, a zatim je svaki sistem napunjen sa po 15 cm³ odgovarajućeg medijuma (cDMEM ili RPMI). Sistem je zatim smeštan u inkubator sa zasićenim vlažnim vazduhom i 5 % CO₂, na 37 °C, dok je peristaltička pumpa držana van inkubatora. Za gajenje imobilisanih C6 ćelija primenjene su 2 različite vrednosti protoka medijuma kroz sistem: 0,12 i 0,30 cm³ min⁻¹, kojima odgovaraju površinske brzine od 40 i 100 μm s⁻¹, redom, dok je za gajenje imobilisanih NCI-H460 ćelija primenjen protok od 0,30 cm³ min⁻¹ (površinska brzina 100 μm s⁻¹). Uklanjanje mehurova iz komore bioreaktora vršeno je svakih 24 h.

Paralelno sa eksperimentima u bioreaktoru, kao kontrola izvedeni su eksperimenti u statičnim uslovima: po 0,5 g mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama gajeno je u Petrijevim šoljama ili T-25 flaskovima sa po 15 cm³ odgovarajućeg medijuma, u inkubatoru sa zasićenim vlažnim vazduhom i 5 % CO₂, na 37 °C. Eksperimenti u statičnim uslovima sa imobilisanim C6 ćelijama trajali su 6 i 13 dana za prvu i drugu eksperimentalnu seriju, redom, a sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama 4 dana.

Svi eksperimenti rađeni su u triplicatu. Tokom gajenja, svakog 4. dana je 40 % medijuma zamenjeno svežim medijumom.

U eksperimentima sa C6 ćelijskom linijom, za određivanje koncentracije i vijabilnosti ćelija uzorkovano je po 0,15–0,30 g mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama 24 h nakon imobilizacije, kao i na kraju eksperimenta (6., odnosno 13. dana). Za kvalitativni MTT test uzorkovano je po 0,1 g Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama 24 h nakon imobilizacije, kao i na kraju eksperimenta (6., odnosno 13. dana).

U eksperimentima sa NCI-H460 ćelijskom linijom, za *Live/dead* esej uzorkovano je po 1–2 cm mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama 24 h nakon imobilizacije, kao i na kraju eksperimenta (4. dan). Za kvantitativni MTT test uzorkovano je po 0,07 g Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama na kraju eksperimenta (4. dan).

3.6. Tretman 2D i 3D ćelijskih kultura antitumorskim lekovima

Efikasnost antitumorskih lekova doksorubicina, cisplatina, etopozida i vinorelbina, kao i njihov uticaj na gensku ekspresiju, ispitivani su u 2D i 3D kulturama ćelijskih linija K7M2-wt i NCI-H460. NCI-H460 ćelije imobilisane u Ba-alginatnim mikrovlaknima, kao i NCI-H460 ćelije gajene u 2D kulturi, tretirane cisplatinom, etopozidom i vinorelbinom, dok su K7M2-wt ćelije imobilisane u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima, kao i K7M2-wt ćelije gajene u 2D kulturi, tretirane su doksorubicinom.

3.6.1. Tretman 2D i 3D NCI-H460 ćelijskih kultura cisplatinom, etopozidom i vinorelbinom

Za određivanje efikasnosti cisplatina, etopozida i vinorelbina, 2D i 3D kulture NCI-H460 ćelija održavane su u mikrotitar pločama sa 96 bunarića. Za 2D kulture, u svaki bunarić je zasejano po 10^4 ćelija u $0,1\text{ cm}^3$ medijuma RPMI. Nakon 24 h od sejanja ćelije su, u zasebnim eksperimentima, tretirane sa različitim koncentracijama cisplatina (0,5, 1, 5, 10 i 25 μM), etopozida (0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 i 500 μM) i vinorelbina (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 i 1000 nM) i inkubirane 72 h na $37\text{ }^\circ\text{C}$ i 5 % CO_2 . Za 3D kulture, u svaki bunarić je stavljeno po 3 cm Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama u $0,1\text{ cm}^3$ medijuma RPMI 24 h nakon imobilizacije ćelija. Za određivanje efikasnosti cisplatina, ćelije su tretirane sa različitim koncentracijama cisplatina (0,5, 1, 5, 10, 25 i 50 μM) u 2 eksperimentalne serije: 24 h nakon imobilizacije (prva eksperimentalna serija) i 96 h nakon imobilizacije (druga eksperimentalna serija). Za određivanje efikasnosti etopozida i vinorelbina, ćelije su 24 h nakon imobilizacije, u zasebnim eksperimentima, tretirane sa različitim koncentracijama etopozida (0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 i 500 μM) i vinorelbina (1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 i 1000 nM) i inkubirane 72 h na $37\text{ }^\circ\text{C}$ i 5 % CO_2 . Eksperimenti su izvedeni u 4 replikata i ponovljeni su najmanje 2 puta. Netretirane ćelije služile su kao kontrola.

Za analizu genske ekspresije, 2D i 3D kulture NCI-H460 ćelija održavane su u su adherentnim T-25 flaskovima. Za 2D kulture, ćelije su zasejane u gustini 1×10^6 ćelija po flasku, sa po 5 cm^3 medijuma RPMI. Nakon 24 h od sejanja, u zasebnim eksperimentima, ćelije su tretirane sa odgovarajućim koncentracijama cisplatina (0,5 μM), etopozida (0,4 μM) ili vinorelbina (17 nM) i inkubirane 24 h na $37\text{ }^\circ\text{C}$ i 5 % CO_2 . Za 3D kulture, Ba-alginatna mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama su nakon imobilizacije raspoređena u T-25 flaskove (0,5 g mikrovlakana u 15 cm^3 medijuma RPMI po flasku) i gajena 96 h u inkubatoru na $37\text{ }^\circ\text{C}$ i 5 % CO_2 . Zatim su imobilisane ćelije tretirane sa odgovarajućim koncentracijama cisplatina (5 μM), etopozida (1 μM) ili vinorelbina (40 nM) i inkubirane još 24 h na $37\text{ }^\circ\text{C}$ i 5 % CO_2 . Eksperimenti su izvedeni u triplicatu i ponovljeni su najmanje 2 puta. Netretirane ćelije služile su kao kontrola.

3.6.2. Tretman 2D i 3D K7M2-wt ćelijskih kultura doksorubicinom

Za određivanje efikasnosti doksorubicina, 2D i 3D kulture K7M2-wt ćelija održavane su u mikrotitar pločama sa 96 bunarića. Za 2D kulture, u svaki bunarić je zasejano po 10^4 ćelija u $0,1 \text{ cm}^3$ medijuma cDMEM. Nakon 24 h od sejanja, ćelije su tretirane sa različitim koncentracijama doksorubicina ($0,5$, 1 , 2 , 5 i $10 \mu\text{g cm}^{-3}$) i inkubirane 24 h na 37°C i 5% CO_2 . Za 3D kulture, u svaki bunarić je stavljeno po 3 cm mikrovlakana (Ca-alginatnih ili HAP/Ca-alginatnih) sa imobilisanim ćelijama u $0,1 \text{ cm}^3$ medijuma cDMEM 24 h nakon imobilizacije ćelija. Zatim su ćelije tretirane sa različitim koncentracijama doksorubicina ($0,25$, $0,5$, 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 10 i $20 \mu\text{g cm}^{-3}$) i inkubirane 24 h na 37°C i 5% CO_2 . Eksperimenti su izvedeni u 6 replikata, a oni u 2D kulturama i alginatnim mikrovlaknima su ponovljeni najmanje 3 puta. Netretirane ćelije služile su kao kontrola.

Za analizu genske ekspresije, 2D i 3D kulture K7M2-wt ćelija održavane su u adherentnim T-25 flaskovima. Za 3D kulture, Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama su nakon imobilizacije raspoređena u T-25 flaskove ($2,7 \text{ g}$ mikrovlakana u 40 cm^3 medijuma cDMEM po flasku) i gajena 24 h u inkubatoru na 37°C i 5% CO_2 . Zatim su imobilisane ćelije tretirane sa odgovarajućom koncentracijom doksorubicina ($1 \mu\text{g cm}^{-3}$). Nakon inkubacije sa lekom 24 h, tretman je odstranjen, a mikrovlakna su prebačena u svež medijum cDMEM i gajena još 5 dana (ukupno 7 dana od imobilizacije). Netretirane ćelije imobilisane u mikrovlaknima gajene 1 dan i 7 dana služile su kao 3D kontrola. Na kraju gajenja, ćelije iz mikrovlakana su oslobođene rastvaranjem mikrovlakana u rastvoru 2 mas. % Na-citrata ($2,28 \text{ mas. \% Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) prema odnosu: $0,1 \text{ g}$ vlažnih mikrovlakana u 1 cm^3 rastvora. Nakon 10 min na 37°C , ćelijska suspenzija je centrifugirana na $1300 \text{ obrtaja min}^{-1}$, 5 min, nakon čega je supernatant odstranjen, a talog ćelija je 2 puta ispran u $1 \times \text{PBS}$. Kao 2D kontrola, ćelije su zasejane u gustini 1×10^6 ćelija po flasku, sa po 5 cm^3 medijuma cDMEM i gajene 24 h na 37°C i 5% CO_2 . Eksperimenti su izvedeni u triplikatu i ponovljeni su 3 puta.

3.7. Eksperiment za određivanje intersticijalne brzine medijuma kroz mikrovlakna u protočnim uslovima

Radi ispitivanja prenosa mase iz alginatnih mikrovalakana u statičnim uslovima, kao i u pakovanom sloju u protočnom bioreaktoru, izvedena je posebna eksperimentalna serija sa Ca-alginatnim mikrovlaknima sa nanočesticama srebra i medom.

3.7.1. Dobijanje kompozitnih Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom

Nanočestice srebra dobijene su hemijskom redukcijom jona srebra u vodenom rastvoru meda (dve šarže), prema proceduri opisanoj u literaturi (*Stojkowska i sar., 2019*). Ukratko, med je rastvoren u destilovanoj vodi tako da se dobije finalna koncentracija od 50 mas. %. Zatim je u rastvor dodat AgNO_3 u finalnoj koncentraciji od 3,9 mM. Nakon toga, rastvor NaOH (1 M) je ukapavan kako bi se povećala vrednost pH na 9 i pokrenula redukcija jona Ag^+ . Nakon dostizanja željene vrednosti pH, rastvor je ostavljen 4 dana u mraku na sobnoj temperaturi, a potom pomešan sa vodenim rastvorom Na-alginata tako da finalne koncentracije komponenti u rastvoru budu: 2,8 mas. % Na-alginata, 30 mas. % meda i 2,34 mM srebra. Kompozitna mikrovlakna dobijena su ručnim istiskivanjem dobijenog rastvora kroz čeličnu iglu sa ravnim vrhom veličine 22 G (unutrašnji prečnik $0,41 \text{ mm}$, *Small Parts Inc.*, SAD) u rastvor za geliranje koji je sadržao 0,73 M Ca^{2+} (17,24 mas. % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Nakon 30 min u rastvoru za geliranje, dobijena kompozitna Ca-alginatna mikrovlakna sa nanočesticama srebra i medom prebačena su u destilovanu vodu i držana u mraku na 4°C do daljih ispitivanja.

3.7.2. Ispitivanje otpuštanja srebra iz kompozitnih Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom

Kinetika otpuštanja srebra iz kompozitnih Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom ispitivana je u uslovima kontinualnog protoka, u protočnom bioreaktoru *3D Perfuse*. U komoru bioreaktora smeštano je po 0,5 g vlažnih mikrovlakana i sistem je napunjen sa 15 cm³ kompletnog medijuma cDMEM. Po 3 bioreaktorska sistema za svaku vremensku tačku držana su u inkubatoru sa 5 % CO₂, na 37°C, pri protoku medijuma od 0,25 cm³ min⁻¹, koji odgovara površinskoj brzini od 80 μm s⁻¹. Kao kontrola, izvedeni su eksperimenti u statičnim uslovima, u duplikatu, u kojima je po 0,5 g vlažnih mikrovlakana stavljeno u plastične Petri šolje površine 58 cm² sa 15 cm³ kompletnog medijuma cDMEM i držano u inkubatoru sa 5 % CO₂, na 37°C. Eksperimenti u protočnim i statičnim uslovima trajali su 1, 2, 5 i 7 dana, a na kraju svakog eksperimenta je analizirana koncentracija srebra u medijumu.

3.7.3. Određivanje koncentracije srebra

Kako bi se pokazalo prisustvo nanočestica srebra u kompozitnim Ca-alginatnim mikrovlaknima sa nanočesticama srebra i medom nakon rastvaranja, korišćena je UV-vidljiva spektroskopija. Za snimanje apsorpcionog spektra koloida pomoću UV-vidljivog spektrofotometara (*UV-3100, Mapada, Kina*) uzorkovano je 0,1 cm³ koloidnog rastvora i razblaženo sa 2,9 cm³ destilovane vode. Sa druge strane, za utvrđivanje prisustva nanočestica srebra u mikrovlaknima, rastvarano je 0,1 g vlažnih vlakana u 2,9 cm³ rastvora 2 mas. % Na-citrata i određivan je spektar. Sva merenja vršena su u triplicatu.

Početna koncentracija srebra u kompozitnim Ca-alginatnim mikrovlaknima sa nanočesticama srebra i medom određena je rastvaranjem mikrovlakana u rastvoru 2 mas. % Na-citrata (0,1 g u 3 cm³), nakon čega je dodato 10 cm³ rastvora NH₄OH (25 %). Sa druge strane, u uzorke medijuma na kraju eksperimenata dodavan je rastvor 25 % NH₄OH u odnosu 2:1 kako bi se oksidovale otpuštene nanočestice srebra i rastvorio talog AgCl. U eksperimentima u protočnom bioreaktoru Istovremeno su i sistem creva za recirkulaciju medijuma, kao i rezervoar bioreaktorskog sistema, isprani istim rastvorom. Na kraju je koncentracija srebra u svim dobijenim rastvorima određena pomoću atomske apsorpcione spektroskopije (AAS), korišćenjem *Agilent Technologies 240FS AA* spektrofotometra (*Agilent Technologies, SAD*).

3.8. Analitičke metode

3.8.1. Određivanje koncentracije i vijabilnosti imobilisanih ćelija

Ca-algintana mikrovlakna sa imobilisanim C6 ćelijama su rastvarana kako bi se ćelije oslobodile i brojale pomoću hemocitometra. Ukratko, po 0,15–0,30 g mikrovlakana je rastvarano u 4 puta većoj zapremini rastvora 2 mas. % Na-citarata (2,28 mas. % Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) ili 10 mas. % Na₂-EDTA (11,07 mas. % Na₂-EDTA·2H₂O) 5 min u inkubatoru i zatim još 5 min na sobnoj temperaturi uz mešanje. Zatim je 0,1 cm³ ćelijske suspenzije mešano sa 0,1 cm³ boje tripan plavo, odakle je 0,01 cm³ uzorka naneto na hemocitometar i ćelije su brojane pod optičkim mikroskopom (*Olympus Vanox, Olympus, Japan*). Žive i mrtve ćelije moguće je razlikovati na osnovu obojenja. Naime, boja tripan plavo prodire kroz oštećenu ćelijsku membranu mrtvih ćelija i na taj način ih boji, dok kroz neoštećenu ćelijsku membranu živih ćelija boja ne prolazi, pa one ostaju nebojene. Vijabilnost ćelija je određena na osnovu odnosa broja živih i mrtvih ćelija, odnosno nebojenih i obojenih. Za svaku eksperimentalnu tačku mikrovlakna su rastvarana najmanje 2 puta, od čega je korišćeno najmanje 3 različita uzorka za brojanje ćelija.

3.8.2. Histopatološka analiza

Uzorci Ca-alginatnih i HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama fiksirani su potapanjem u 4 % neutralno-puferisan formaldehid. Nakon fiksacije, uzorci su rutinski histološki obrađeni, dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola, tretirani ksilolom i ukalupljeni u parafinske blokove. Parafinski blokovi su sečeni na preseke debljine 5 μm pomoću rotacionog mikrotoma (*Leica Reinhart*, Austrija i *Leica SM*, 2000 R, Nemačka). Dobijeni preseci bojeni su hematoksilin-eozin (HE) metodom (*Gamble*, 2007) i metodom za dokazivanje retikulinskih vlakana (*Bancroft i Layton*, 2018). Preparati su analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa (*Olympus BX51*, Japan), a mikrofotografije su slikane sa *Olympus DP70* kamerom.

3.8.3. Određivanje prečnika mikrovlakana i veličine agregata

Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim C6 ćelijama slikana su optičkim mikroskopom *Motic BA210* (*Motic*, Kina) povezanim sa programom za analizu slike *Motic Image Plus 2.0*, koji je korišćen za merenje prečnika mikrovlakana. Srednji prečnik određen je merenjem najmanje 10 prečnika mikrovlakana.

Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim HOS i U2OS ćelijama, kao i HOS sferoidima, slikana su invertnim mikroskopom *Dmi1* (*Leica Microsystems*, Nemačka). Prečnici mikrovlakana mereni su u programu *ImageJ* (*National Institutes of Health*, SAD), a srednji prečnik je određen merenjem najmanje 10 prečnika iz svake grupe.

Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama, kao i kontrolna Ca-alginatna mikrovlakna, slikana su invertnim mikroskopom (*Olympus CKX53*, Japan) povezanim sa programom za analizu slike *cellSens Entry* (*Olympus*, Nemačka). Srednji prečnik mikrovlakana određen je merenjem najmanje 20 prečnika oba tipa mikrovlakana.

Ba-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama slikana su invertnim mikroskopom (*Olympus*, Nemačka). Prečnici mikrovlakana mereni su u programu *ImageJ*, a srednji prečnik je određen merenjem najmanje 20 prečnika.

Za određivanje veličine ćelijskih agregata K7M2-wt ćelija u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima izmereno je po najmanje 190 agregata u svakoj grupi. Za svaki agregat je pomoću programa *cellSens Entry* izmeren najveći (d_{max}) i najmanji (d_{min}) prečnik, na osnovu kojih je izračunat ekvivalentni prečnik prema jednačini (*Tudor i sar.*, 2004):

$$d_e = \sqrt{d_{max} \cdot d_{min}} \quad (3.1)$$

3.8.4. Imunofluorescentna citohemijska analiza

U cilju dobijanja antigena, iz histoloških preparata Ca-alginatnih i HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama uklonjen je parafin, a zatim su preparati rehidratirani i tretirani citratnim puferom (pH=6), nakon čega su isprani u 0,1 M PBS i inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi u *Ultra V Block* rastvoru kako bi se smanjilo nespecifično bojenje pozadine. Zatim su preko noći preparati inkubirani sa mišjim anti-tubulin antitelom u rastvaraču *OP Quanto* (razblaženje 1:5000). Narednog dana, preseci su isprani 3 puta u 1 $\times$ PBS, a zatim inkubirani 1 h na sobnoj temperaturi sa kozjim anti-mišjim IgG (H+L) sekundarnim antitelima obeleženim odgovarajućom fluorescentnom bojom *Alexa Fluor 594*, razblaženim 1:500 u rastvaraču *OP Quanto*. Jedra su obojena sa 0,1 mg cm⁻³ DAPI. Uzorci su analizirani korišćenjem fluorescentnog mikroskopa *ZEISS Axiovert 5* i softvera *ZEISS Microscopy Software ZEN8* (*Carl ZEISS*, Nemačka).

3.8.5. Live/Dead esej

Live/Dead esej za vizuelizaciju živih i mrtvih ćelija korišćen je za određivanje vijabilnosti ćelija HOS, U2OS i NCI-H460, kao i HOS sferoida, nakon imobilizacije, kao i u odgovarajućim vremenskim tačkama tokom gajenja ćelija u mikrovlaknima. Ovaj esej se zasniva na korišćenju fluorescentnih

boja koje različito boje žive i mrtve ćelije na osnovu stanja njihove membrane: kalcein-AM (CAM) fluorescira zelenom bojom u živim ćelijama, dok propidijum-jodid (PI) emituje crvenu fluorescenciju u mrtvim ćelijama. Esej je izveden na sledeći način:

- 1) Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim HOS i U2OS ćelijama i HOS sferoidima inkubirana su 30 min na 37°C sa 0,1 μM CAM i 50 ng cm^{-3} PI u mikroploči sa 8 bunarića (*Ibidi*, Nemačka) (1 cm mikrovlakana u 0,1 cm^3 rastvora boja u medijumu cDMEM po bunariću), nakon čega su isprana 3 puta u 1× PBS, u svaki bunarić je dodato po 0,1 cm^3 medijuma cDMEM i mikrovlakna su slikana pod konfokalnim mikroskopom *Leica TCS SP8* (*Leica Microsystems*, Nemačka).
- 2) Ba-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama inkubirana su 30 min na 37°C sa 4 μM CAM i 5 μM PI u mikrotitar pločama sa 96 bunarića (1–2 cm mikrovlakana u 0,1 cm^3 rastvora boja u medijumu RPMI po bunariću), nakon čega su isprana 3 puta u 1× PBS, ostavljena u po 0,05 cm^3 PBS i slikana pomoću *ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System* (*Molecular Devices*, SAD).

3.8.6. MTT test

Metabolička aktivnost ćelija imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima analizirana je pomoću kolorimetrijskog MTT testa. Ovim testom se određuje vijabilnost ćelija na osnovu njihove sposobnosti da metabolišu MTT. U živim, metabolički aktivnim ćelijama, MTT se redukuje u kristale formazana tamno ljubičaste boje, što se vizualno može potvrditi optičkom mikroskopijom (kvalitativni MTT test), dok se koncentracija formazana može izmeriti spektrofotometrijski, nakon rastvaranja u DMSO (kvantitativni MTT test) (*Mosmann*, 1983).

- 1) Kvalitativni MTT test korišćen je u eksperimentima u bioreaktorskom sistemu sa C6 ćelijskom linijom. Uzorci Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama od 0,1 g smeštani su u bunariće mikrotitar ploča sa 24 bunarića, u po 1 cm^3 rastvora MTT (koncentracije 0,5 mg cm^{-3} u medijumu cDMEM) i inkubirani 2 h na 37 °C i 5 % CO_2 . Nakon inkubacije, mikrovlakna su slikana pod optičkim mikroskopom *Motic BA210* u cilju vizualizacije metabolički aktivnih ćelija.
- 2) Kvantitativni MTT test korišćen je u eksperimentima u bioreaktorskom sistemu sa NCI-H460 ćelijskom linijom. Uzorci Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama od 0,07 g smeštani su u bunariće mikrotitar ploča sa 12 bunarića, u po 1,5 cm^3 rastvora MTT (koncentracije 0,5 mg cm^{-3} u medijumu RPMI) i inkubirani 3 h na 37 °C i 5 % CO_2 . Nakon inkubacije, medijum sa MTT reagensom je uklonjen, a u svaki bunarić je dodato po 0,75 cm^3 DMSO kako bi se rasvorili formirani kristali formazana, nakon čega je merena apsorbanca dobijenih rastvora na talasnoj dužini od 570 i 690 nm pomoću automatskog mikrotitarskog čitača *Multiskan Sky* (*Thermo Scientific*, SAD). Krajnja vrednost apsorbance izračunata je kao razlika između apsorbaneci na 570 i 690 nm ($A_{570} - A_{690}$).
- 3) Kvantitativni MTT test korišćen je i u eksperimentima u statičkim uslovima sa K7M2-wt ćelijskom linijom. Uzorci Ca-alginatnih i HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama (3 uzorka dužine 3 cm) smeštani su u bunariće mikrotitar ploča sa 24 bunarića, u po 0,1 cm^3 rastvora MTT (koncentracije 0,5 mg cm^{-3} u medijumu cDMEM) i inkubirani 4 h na 37°C i 5 % CO_2 . Nakon inkubacije, medijum sa MTT reagensom je uklonjen, a u svaki bunarić je dodato po 0,5 cm^3 DMSO kako bi se rasvorili formirani kristali formazana, nakon čega je merena apsorbanca dobijenih rastvora na talasnoj dužini od 570 nm pomoću UV-vidljivog spektrofotometra (*UV-3100*, *Mapada*, Kina).
- 4) Kvantitativni MTT test korišćen je i za analizu efikasnosti antitumorskih lekova, koja je određena preko koncentracije leka koja dovodi do inhibicije ćelijskog rasta za 50 % (IC_{50}). U eksperimentima sa tretmanom 2D i 3D K7M2-wt ćelijskih kultura doksorubicinom, u svaki bunarić je dodato po 0,1 cm^3 rastvora MTT (koncentracije 1 mg cm^{-3} medijuma cDMEM). Nakon 4 h, medijum sa MTT reagensom je uklonjen, a formirani kristali formazana su rastvoreni u po 0,05 cm^3 DMSO. Vrednosti apsorbance dobijenih rastvora su merene na

talasnoj dužini od 570 nm pomoću mikrotitarskog čitača *Tecan Infinite 200 PRO* (*Tecan Group Ltd.*, Švajcarska). U eksperimentima sa tretmanom 2D i 3D NCI-H460 ćelijskih kultura cisplatinom, etopozidom i vinorelbinom, u svaki bunarić je dodato po 0,2 cm³ rastvora MTT (koncentracije 0,5 mg cm⁻³ medijuma RPMI). Nakon 3 h, medijum sa MTT reagensom je uklonjen, a formirani kristali formazana su rastvoreni u po 0,05 cm³ DMSO. Apsorbanca dobijenih rastvora merena je na način opisan u stavci 2).

3.8.7. Analiza genske ekspresije

Analiza genske ekspresije sprovedena je u 3 koraka. Prvo je izvršena izolacija RNK iz NCI-H460 ćelija gajenih u 2D kulturama i Ba-alginatnim mikrovlaknima, kao i iz K7M2-wt ćelija gajenih u 2D kulturama i Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima. Zatim su sprovedeni tretman deoksiribonukleazom (DNK-aza) i reakcija reverzne transkripcije, dok je u trećem koraku izvedena kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR).

3.8.7.1. Izolacija RNK

Izolacija ukupne RNK sprovedena je na 2 različita načina, u zavisnosti od tipa uzorka. Iz K7M2-wt i NCI-H460 ćelija gajenih u 2D kulturi, kao i iz K7M2-wt ćelija gajenih u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima, RNK je izolovna na sledeći način. Ćelije su lizirane dodavanjem 1 cm³ Trizol reagensa i homogenizovane provlačenjem kroz pipetu nekoliko puta. Uzorci su zatim inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi kako bi se obezbedila potpuna disocijacija nukleoproteinskih kompleksa. U svaki uzorak je potom dodato po 0,2 cm³ hloroforma i nakon 2-3 min inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 15 min na 12000 × g i 4 °C, u centrifugi sa hlađenjem (*Centrifuge 5427R Eppendorf*, Nemačka), kako bi se smeša razdvojila na 3 faze: donju fenol-hloroformsku (crvene boje), međufazu i gornju vodenu fazu (bezbojna), u kojoj je RNK. Vodena faza je zatim odvojena i u nju je dodato 0,5 cm³ izopropanola. Nakon inkubacije 10 min na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani 10 min na 12000 × g i 4 °C kako bi se RNK istaložila i formirala beli talog. Supernatant je potom uklonjen, a talog ispran sa 1 cm³ etanola (75 %). Nakon centrifugiranja 5 min na 7500 × g i 4 °C, etanol je odstranjen, a talog ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi se osušio. Na kraju, RNK je rastvorena u 1 % DEPC vodi (voda tretirana dietilpirokarbonatom kako bi se deaktivirale ribonukleaze (RNK-aze) u vodi), a koncentracija RNK određivana je spektrofotometrijski (*Biophotometer*, *Eppendorf*, Nemačka).

Sa druge strane, ekstrakcija ukupne RNK iz NCI-H460 ćelija gajenih u Ba-alginatnim mikrovlaknima rađena je prema modifikovanom protokolu (*Gasic i sar.*, 2004). Procedura je podrazumevala homogenizaciju približno 150–200 mg mikrovlakana u avanu u tečnom azotu. U uzorke je zatim dodato po 0,65 cm³ ekstrakcionog pufera (2 % CTAB; 2 % PVP; 0,1 % DEPC; 25 mM EDTA; 100 mM TRIS-HCl pH 8; 2 M NaCl; 0,5 g dm⁻¹ spermidina) i 0,015 cm³ β-merkaptetoetanol. Nakon inkubacije 15 min u vodenom kupatilu na 60 °C, u svaki uzorak je dodato 0,65 cm³ smeše hloroform : izoamilalkohol (u zapreminskom odnosu 24:1). Zatim su uzorci centrifugirani 10 min na 10000 × g i na 4 °C, čime se RNK izdvojila u gornjoj, bezbojnoj fazi. Postupak ekstrakcije hloroformom i izoamilalkoholom ponovljen je još jednom. U supernatant je dodato 0,166 cm³ 7,5 M LiCl, a nakon toga su uzorci inkubirani na 4 °C preko noći. Nakon precipitacije, uzorci su centrifugirani 45 min na 12000 × g na 4 °C. Supernatant je odbačen, nakon čega je talog ispran dodatkom 1 cm³ 70 % etanola. Uzorci su zatim centrifugirani 10 min na 12000 × g na 4 °C, a supernatant ponovo odstranjen. Talog RNK je sušen na vazduhu u laminarnoj komori tokom 5 min, potom rastvoren u 0,1 cm³ vode tretirane DEPC nakon čega je dodato 0,01 cm³ 3 M Na-acetata (pH 5,5) i 0,275 cm³ 70 % etanola. Uzorci su inkubirani 1,5 h na -70 °C i zatim centrifugirani 45 min na 12000 × g na 4 °C uz odlivanje supernatanta. Ponovljeno je ispiranje etanolom i centrifugiranje uzoraka, kao u prethodno opisanom postupku. Uzorci su ponovo sušeni u laminarnoj komori tokom 10 min, nakon čega je talog RNK resuspendovan u 0,05 cm³ DEPC vode i čuvan na -70 °C do upotrebe.

3.8.7.2. Tretman DNK-azom i reakcija reverzne transkripcije

Kako bi se uklonila eventualna zaostala genomski DNK, uzorci RNK su pre reakcije reverzne transkripcije tretirani DNK-azom (*DNase I*, Thermo Scientific, SAD). Tretman je vršen u reakcionoj smeši zapremine 0,01 cm³, sastava 0,001 cm³ 10× *DNase I* pufer, 0,001 cm³ *DNase I* (1 U mm⁻³), 0,00025 cm³ inhibitora RNK-aze (40 U mm⁻³), 0,001-0,00675 cm³ RNK (u zavisnosti od koncentracije RNK) i DEPC voda do krajnje zapremine. Smeša je inkubirana 30 min na 37 °C, nakon čega je reakcija zaustavljena dodavanjem 0,001 cm³ EDTA i inkubiranjem smeše 10 min na 65 °C, a zatim hlađenjem na ledu. Za reakciju reverzne transkripcije (RT) korišćen je kit za reverznu transkripciju velikog kapaciteta (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, Life Technologies, SAD) prema uputstvu proizvođača. Sastav reakcione smeše, zapremine 0,02 cm³ bio je sledeći: 0,002 cm³ 10 × RT pufer, 0,0008 cm³ 25 × dNTP miks (100 mM), 0,002 cm³ 10 × RT *Random* prajmeri, 0,001 cm³ *MultiScribe*TM reverzna transkriptaza (50 U mm⁻³), 0,0042 cm³ DEPC voda i 1 µg ukupne RNK dobijene nakon tretmana DNK-azom. Reakcija reverzne transkripcije se odvijala u mašini *Mastercycler® nexus Gradient* (Eppendorf, Nemačka) u tri temperaturna koraka, 10 min na 25 °C, 120 min na 37 °C i 5 min na 85 °C. Dobijena cDNK (100 ng mm⁻³) čuvana je na -20 °C do korišćenja u kvantitativnoj lančanoj reakciji polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR).

3.8.7.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR)

Dobijena cDNK je amplifikovana u reakciji qRT-PCR pomoću *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* reagensa u aparatu *QuantStudio 3 Real-Time PCR system* (Thermo Fisher Scientific, SAD) (NCI-H460 ćelije) ili *Power SYBR Green PCR Master Mix* reagensa u aparatu *CFX Opus 96* (BIO-RAD, Kalifornija, SAD) (K7M2-wt ćelije), prema uputstvu proizvođača. Za amplifikaciju su korišćeni sledeći prajmeri:

MDR1

5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3' (napredni)

5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA-3' (povratni)

ABCC1

5'-CGG AAA CCA TCC ACG ACC CTA ATC C-3' (napredni)

5'-ACC TCC TCA TTC GCA TCC ACC TTG G-3' (povratni)

ABCG2

5'-TCT CTT CTT CCT GAC CTG CTG-3' (napredni)

5'-AAA CCA CAC TCT GAC CTG CTG-3' (povratni)

ACTB

5'-TGG ACA TCC GCAAAG ACC TGT AC-3' (napredni)

5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG A-3' (povratni)

SOX9

5'-CTTCTGAACGAGAGCGAGA-3' (napredni)

5'-CTGCCCCGTTCTTACCGACTTC-3' (povratni)

GAPDH

5'-GTTGTCTCCTGCGACTTCA-3' (napredni)

5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTC-3' (povratni)

Svaka reakcija rađena je u triplicatu. Relativni nivoi ekspresije analiziranih gena određeni su pomoću $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metode (*Livak i Schmittgen, 2001*). Relativna ekspresija *MDR1*, *ABCC1* i *ABCG2* gena prikazana je kao promena u ekspresiji gena normalizovana na *ACTB* (endogena kontrola), i izražena u odnosu na vrednosti u netretiranim ćelijama u 2D i 3D kulturi, kojima je dodeljena vrednost 1. Relativna ekspresija *SOX9* gena prikazana je kao promena u ekspresiji gena normalizovana na *GAPDH* (endogena kontrola), i izražena u odnosu na vrednost u netretiranim ćelijama u 2D kulturi, kojoj je dodeljena vrednost 1.

3.8.8. Statistička analiza rezultata

Statistička analiza izvršena je pomoću programa *R* (verzija 4.4.2; *R Core Team*, Austrija) i *GraphPad Prism* (*GraphPad Software*, SAD). Za poređenje između tri ili više grupa podataka korišćena je jednofaktorska ANOVA sa *post-hoc* testovima za višestruka poređenja. Za poređenje dve grupe podataka korišćen je t-test, pri čemu je za grupe sa normalnom raspodelom korišćen parametarski t-test (*Welch's test*), dok je za grupe u kojima bar jedna grupa nije imala normalnu raspodelu korišćen neparametarski test (*Mann-Whitney test*). Za analizu normalnosti raspodele korišćen je *Shapiro-Wilk test*. Razlike su smatrane statistički značajnim pri $p \leq 0,05$ (*). Svi rezultati prikazani su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

4. REZULTATI

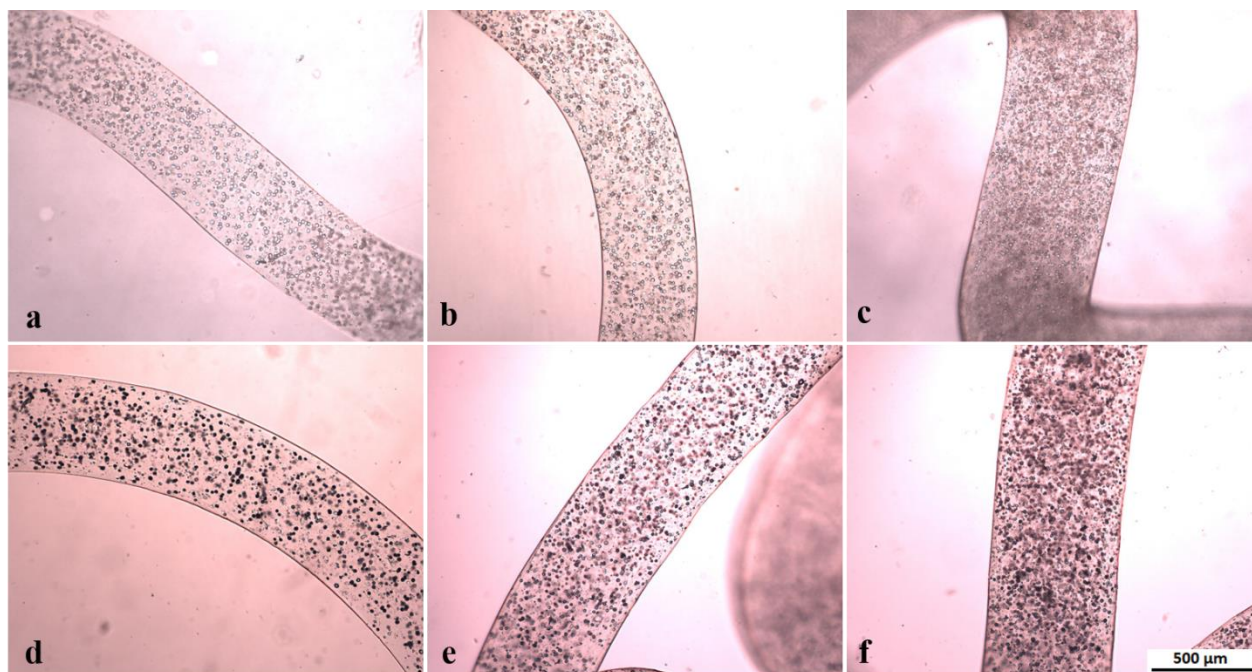
U ovom radu razvijen je 3D *in vitro* model za gajenje malignih ćelija baziran na alginatnim mikrovlaknima u kojima su ćelije imobilisane. Razvoj modela obuhvatao je nekoliko ključnih koraka. U prvom koraku optimizovani su parametri za dobijanje mikrovlakana sa imobilisanim malignim ćelijama, a zatim i uslovi gajenja imobilisanih ćelija. U drugom koraku, model je validiran kroz kratkotrajne i dugotrajne kulture malignih ćelija imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima. U trećem koraku, ispitana je mogućnost primene modela za testiranje antitumorskih lekova.

4.1. Dobijanje mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama

Prethodno razvijena procedura dobijanja mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama je optimizovana u pogledu nekoliko ključnih parametara: 1) koncentracija ćelija u ćelijskoj suspenziji u rastvoru Na-alginata, 2) koncentracija rastvora Na-alginata i sastav rastvora za geliranje i 3) uslovi istiskivanja i dužina geliranja. Pri tome, u okviru optimizacije koncentracije rastvora Na-alginata i sastava rastvora za geliranje ispitivana je optimalna koncentracija rastvora Na-alginata za dobijanje Ca-alginatnih mikrovlakana, kao i odgovarajuća kombinacija koncentracije rastvora Na-alginata i sastava rastvora za geliranje za dobijanje Ba-alginatnih mikrovlakana. Optimizacija je rađena primenom eksperimentalnog pristupa zasnovanog na variranju pojedinačnih parametara, pri čemu su efekti uticaja različitih vrednosti parametara na ćelije analizirani pomoću svetlosne mikroskopije, fluorescentne mikroskopije i MTT testa.

4.1.1. Optimizacija koncentracije ćelija u ćelijskoj suspenziji u Na-alginatnom rastvoru

Uticaj koncentracije ćelija u početnoj suspenziji ćelija u rastvoru Na-alginata, koja direktno utiče na koncentraciju ćelija u dobijenim mikrovlaknima, ispitivana je na C6 ćelijskoj liniji. Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim C6 ćelijama dobijena su ručnim istiskivanjem suspenzija ćelija u 2,8 mas. % rastvoru Na-alginata sa različitim koncentracijama ćelija: 1) $2,5 \times 10^6$ ćel cm^{-3} , 2) 4×10^6 ćel cm^{-3} i 3) 8×10^6 ćel cm^{-3} . Korišćena je igla od 25 G i rastvor za geliranje koji sadrži 180 mM Ca^{2+} , a vreme geliranja je iznosilo 15 min. Prisustvo, raspoređenost i metabolička aktivnost ćelija potvrđena je optičkom mikroskopijom (slika 4.1a, b, c) i MTT testom (slika 4.1d, e, f) 24 h nakon imobilizacije ćelija i njihovog gajenja u medijumu.



Slika 4.1. Mikrofotografije Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim C6 ćelijama dobijenih ručnim istiskivanjem suspenzije 2,8 mas. % rastvora Na-alginata sa različitim koncentracijama ćelija: (a, d) $2,5 \times 10^6$ ćel cm^{-3} , (b, e) 4×10^6 ćel cm^{-3} i (c, f) 8×10^6 ćel cm^{-3} ; (a, b, c) 24 h nakon imobilizacije i (d, e, f) 24 h nakon imobilizacije i 2 h nakon dodavanja MTT reagensa: tamnoljubičasto obojenje predstavlja kristale formazana stvorene u metabolički aktivnim ćelijama (razmernik = 500 μm)

Koncentracija imobilisanih ćelija je određena rastvaranjem mikrovlakana i brojanjem ćelija. Dobijene vrednosti koncentracija ćelija u mikrovlaknima nakon 24 h gajenja prikazane su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Koncentracije ćelija C6 u Ca-alginatnim mikrovlaknima za različite početne koncentracije ćelija u suspenziji 24 h nakon imobilizacije i gajenja u medijumu

<i>Koncentracija ćelija u početnoj suspenziji (ćel cm^{-3})</i>	<i>$2,5 \times 10^6$</i>	<i>4×10^6</i>	<i>8×10^6</i>
<i>Ukupan broj ćelija u mikrovlaknima (ćel g^{-1})</i>	<i>$2,8 \times 10^6$</i>	<i>$5,1 \times 10^6$</i>	<i>$8,0 \times 10^6$</i>
<i>Broj živih ćelija u mikrovlaknima (ćel g^{-1})</i>	<i>$1,4 \times 10^6$</i>	<i>$3,0 \times 10^6$</i>	<i>$3,1 \times 10^6$</i>

Dobijeni rezultati su pokazali da je preživljavanje ćelija nakon istiskivanja 40–60 %, u zavisnosti od početne koncentracije ćelija. Međutim, treba imati na umu da proces rastvaranja mikrovlakana može imati negativne efekte na vijabilnost ćelija, pa se pretpostavlja da je koncentracija živih ćelija u mikrovlaknima veća od dobijene. Na osnovu prikazanih vrednosti može se zaključiti da je početna koncentracija od 4×10^6 ćel cm^{-3} optimalna.

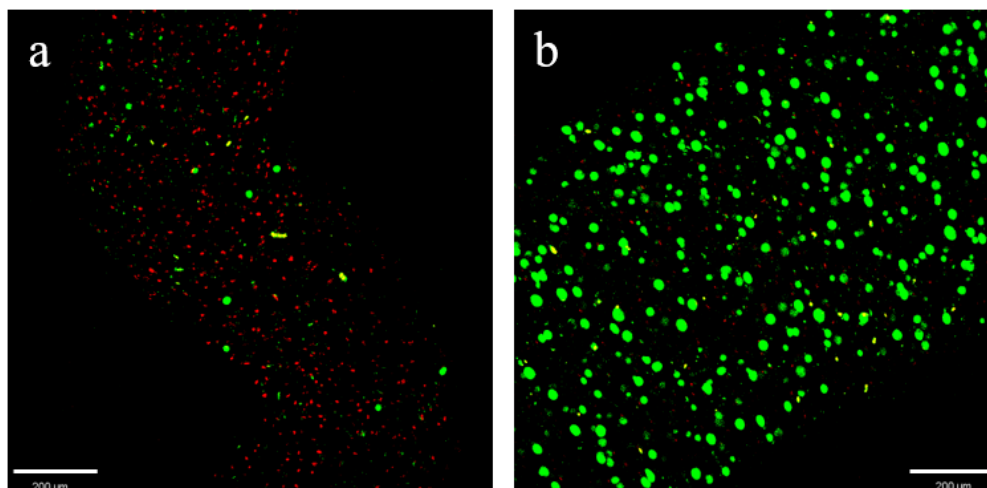
Početna koncentracija ćelija u alginatnoj suspenziji uticala je i na veličinu prečnika mikrovlakana. Za početne koncentracije ćelija od $2,5 \times 10^6$, 4×10^6 i 8×10^6 ćel cm^{-3} izmereni prečnici mikrovlakana iznosili su 455 ± 50 μm , 495 ± 30 μm i 550 ± 80 μm , redom. Ovi rezultati ukazuju da sa porastom koncentracije ćelija u početnoj suspenziji dolazi do blagog porasta prečnika mikrovalakana koje nije statistički značajno.

Na osnovu dobijenih rezultata imobilizacije C6 ćelijske linije, za dalje eksperimente korišćena je početna koncentracija ćelija od 4×10^6 ćel cm^{-3} .

4.1.2. Optimizacija koncentracije rastvora Na-alginata i sastava rastvora za geliranje

4.1.2.1. Optimizacija koncentracije rastvora Na-alginata za dobijanje Ca-alginatnih mikrovlakana

Uticaj koncentracije rastvora Na-alginata u ćelijskoj suspenziji na vijabilnost ćelija nakon formiranja mikrovlakana ispitivan je na HOS ćelijskoj liniji. Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim HOS ćelijama dobijena su ručnim istiskivanjem suspenzije 4×10^6 ćel cm^{-3} u 2 mas. % i 2,8 mas. % rastvoru Na-alginata kroz iglu veličine 25 G u rastvor za geliranje koji je sadržao 180 mM Ca^{2+} . Nakon 15 min geliranja, mikrovlakna su gajena 24 h u medijumu, a preživljavanje ćelija nakon tog perioda je potvrđeno *Live/Dead* esejom (slika 4.2).



Slika 4.2. Fluorescentne mikrofotografije Ca-alginatnih mikrovlakana 24 h nakon imobilizacije HOS ćelija, dobijenih istiskivanjem suspenzije ćelija (4×10^6 ćel cm^{-3}) u rastvoru Na-alginata koncentracije: a) 2 mas. % i b) 2,8 mas. % (*Live/dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 200 µm)

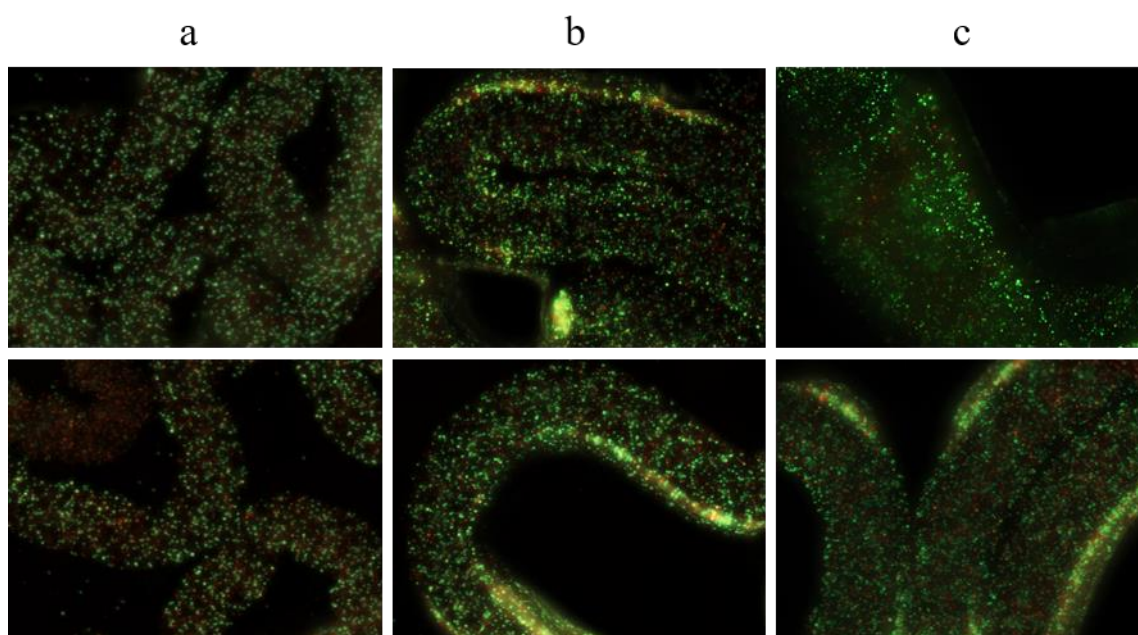
Na slici 4.2 jasno se uočava razlika u vijabilnosti ćelija u mikrovlaknima dobijenim primenom različitih početnih koncentracija rastvora Na-alginata. Ćelije imobilisane u mikrovlaknima dobijenim iz rastvora Na-alginata početne koncentracije 2 mas. % bile su uglavnom mrtve, dok su ćelije u mikrovlaknima dobijenim iz rastvora koncentracije 2,8 mas. % pretežno ostale žive. Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da rastvor manje koncentracije alginata ima manju viskoznost, pa se suspenzija ćelija u 2 mas. % rastvoru Na-alginata lakše istiskuje. S obzirom na to da je istiskivanje vršeno ručno, moguće je da je u ovom slučaju primenjena veća brzina istiskivanja u poređenju sa istiskivanjem suspenzije ćelija u 2,8 mas. % rastvoru Na-alginata, koji ima veću viskoznost. Veća brzina istiskivanja je izazvala veće smicajne napone, što je moglo negativno uticati na vijabilnost ćelija.

4.1.2.2. Optimizacija koncentracije Na-alginata i sastava rastvora za geliranje za dobijanje Ba-alginatnih mikrovlakana

Za imobilizaciju svih ćelijskih linija u alginatna mikrovlakna inicijalno je korišćen rastvor za geliranje koji je sadržao 180 mM Ca^{2+} . Međutim, primećeno je da nakon imobilizacije NCI-H460 ćelijske linije u Ca-alginatna mikrovlakna i gajenja imobilisanih ćelija u RPMI medijumu, mikrovlakna postaju nestabilna, što se ogledalo u bubrenju, a zatim i fragmentisanju mikrovlakana (rezultati nisu prikazani). Da bi se ispitao uticaj medijuma na stabilnost mikrovlakana, Ca-alginatna mikrovlakna su inkubirana 7 dana u medijumu cDMEM i medijumu RPMI. Srednja vrednost prečnika mikrovlakana inkubiranih u medijumu cDMEM iznosila je 645 ± 30 µm nakon 24 h i ostala je gotovo nepromenjena nakon 7 dana (635 ± 15 µm), dok je kod mikrovlakana inkubiranih u RPMI medijumu došlo do značajnog povećanja prečnika sa 740 ± 50 µm na 910 ± 90 µm. Ovi rezultati ukazuju na znatno veće

bubrenje u medijumu RPMI, što verovatno doprinosi slabljenju mikrovlakana i njihovoj degradaciji. Stoga je za dobijanje mikrovlakana sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama koje se gaje u RPMI medijumu ispitana mogućnost geliranja u rastvoru koji sadrži Ba^{2+} umesto Ca^{2+} .

Kako bi se optimizovali parametri za dobijanje Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama, uticaj koncentracije rastvora Na-alginata i koncentracije Ba^{2+} u rastvoru za geliranje na vijabilnost ćelija nakon istiskivanja i formiranja hidrogela ispitan je primenom NCI-H460 ćelijske linije. Ba-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim ćelijama dobijena su ručnim istiskivanjem suspenzije 4×10^6 ćel cm^{-3} u rastvoru Na-alginata koncentracije u opsegu 1,6–2,8 mas. % u rastvor za geliranje koji je sadržao 45, 90 ili 180 mM Ba^{2+} . Za istiskivanje je korišćena igla od 25 G, a geliranje je trajalo 15 min. Nakon 24 h od imobilizacije, preživljavanje ćelija potvrđeno je fluorescentnom mikroskopijom (slika 4.3).



Slika 4.3. Fluorescentne mikrofotografije Ba-alginatnih mikrovlakana 24 h nakon imobilizacije NCI-H460 ćelija, dobijenih istiskivanjem rastvora Na-alginata koncentracije: a) 1,6 mas. %, b) 2 mas. % i c) 2,8 mas. % u rastvor za geliranje koji je sadržao 45 mM Ba^{2+} (gornji red) i 90 mM Ba^{2+} (donji red) (*Live/dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno))

Rezultati su pokazali da koncentracija Ba^{2+} u rastvoru za geliranje ima izražen uticaj na vijabilnost ćelija. Koncentracija Ba^{2+} od 180 mM ispitana je u slučaju rastvora Na-alginata koncentracije 2,8 mas. % i gotovo sve ćelije su bile mrtve, što je ukazalo na negativne efekte ove koncentracije na vijabilnost ćelija. Koncentracija Ba^{2+} od 90 mM imala je umereno negativne efekte na vijabilnost ćelija (slika 4.3, donji red). Nakon istiskivanja ćelijske suspenzije u rastvoru Na-alginata u rastvor za geliranje koji je sadržao 45 mM Ba^{2+} , najveći broj ćelija je preživeo (slika 4.3, gornji red), dok koncentracija Na-alginata nije imala značajan uticaj na vijabilnost ćelija (slika 4.3).

Dodatno, analiziran je uticaj ispitivanih parametara na vrednosti prečnika dobijenih mikrovlakana. Srednje vrednosti prečnika 24 h nakon imobilizacije ćelija prikazane su u Tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Prečnici Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama dobijenih korišćenjem različitih koncentracija rastvora Na-alginata i Ba^{2+} u rastvoru za geliranje, mereni 24 h nakon imobilizacije. Vrednosti prečnika predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Vrednosti obeležene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p > 0,05$), dok različita slova označavaju značajno različite vrednosti ($p < 0,05$). Poređenje je vršeno isključivo između vrednosti dobijenih za jedan konstantan parametar (koncentracija rastvora Na-alginata ili Ba^{2+}).

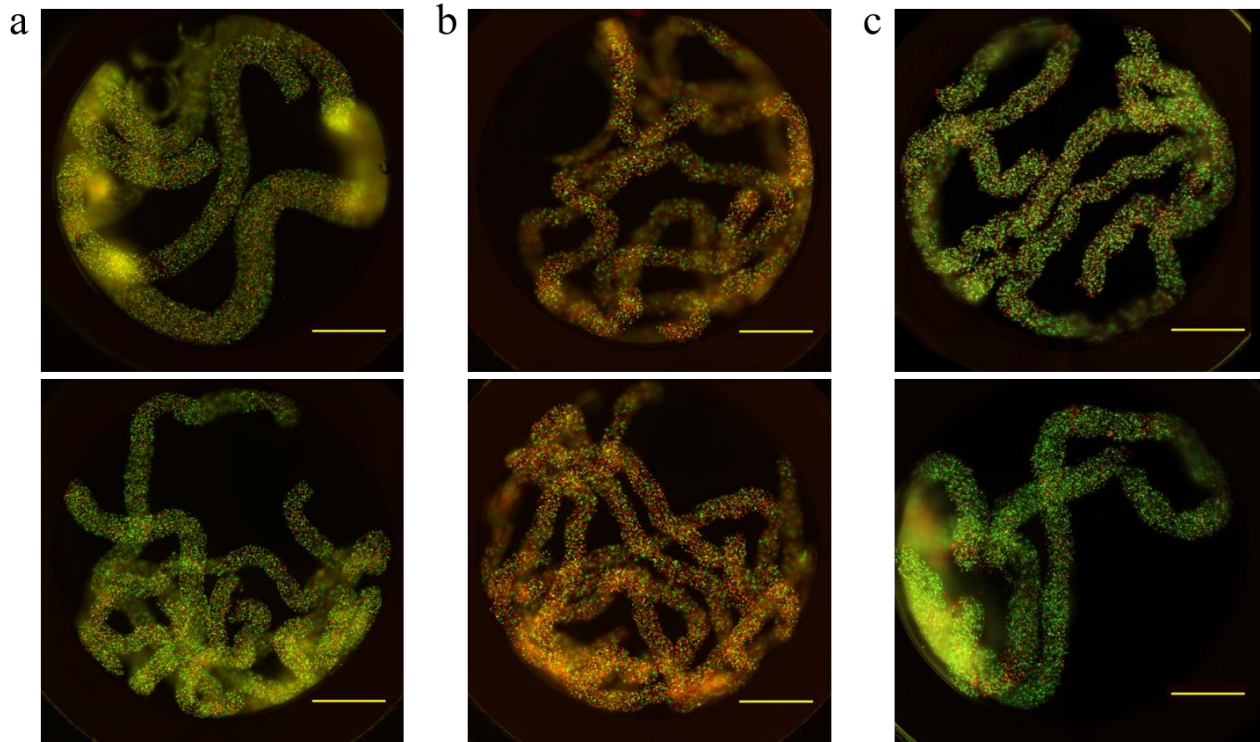
<i>Na-alginat (mas. %)</i>	<i>Ba²⁺ (mM)</i>	
	<i>45</i>	<i>90</i>
<i>1,6</i>	<i>570 $\pm$ 205 μm^a</i>	<i>410 $\pm$ 85 μm^c</i>
<i>2</i>	<i>590 $\pm$ 60 μm^{ab}</i>	<i>470 $\pm$ 65 μm^c</i>
<i>2,8</i>	<i>720 $\pm$ 190 μm^b</i>	<i>605 $\pm$ 80 μm^b</i>

Rezultati su pokazali da i koncentracija Na-alginata i koncentracija Ba^{2+} u rastvoru za geliranje znatno utiču na prečnik dobijenih mikrovlakana (tabela 4.2). Koncentracija Ba^{2+} od 180 mM ispitana je samo u slučaju rastvora Na-alginata koncentracije 2,8 mas. % i dobijena je vrednost prečnika od $575 \pm 45 \mu m$. Povećanje koncentracije Na-alginata od 1,6 do 2,8 mas. % dovelo je do povećanja prečnika mikrovlakana za oko 25–50 %, dok je povećanje koncentracije Ba^{2+} u rastvoru za geliranje od 45 do 180 mM dovelo do smanjenja prečnika mikrovlakana za oko 25 %.

S obzirom da su geliranjem suspenzije ćelija u 2,8 mas. % rastvoru Na-alginata dobijena mikrovlakna prečnika $>700 \mu m$, što bi potencijalno moglo dovesti do difuzionih ograničenja kiseonika i nutrijenata do ćelija u centru mikrovlakana, ova koncentracija je odbačena iz dalje analize. Sa druge strane, mala viskoznost 1,6 mas. % rastvora Na-alginata je tokom istiskivanja dovela do neujednačenog toka suspenzije, što je rezultovalo značajnim devijacijama u vrednostima prečnika mikrovlakana (tabela 4.2). Finalno, suspenzija NCI-H460 ćelija (4×10^6 ćel cm^{-3}) u 2 mas. % rastvoru Na-alginata i rastvor za geliranje koji sadrži 45 mM Ba^{2+} izabrani su za dobijanje Ba-alginatnih mikrovlakana u daljim eksperimentima.

4.1.3. Optimizacija uslova istiskivanja i dužine geliranja

U okviru optimizacije procesa istiskivanja za dobijanje alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama, analiziran je uticaj unutrašnjeg prečnika igle, brzine istiskivanja i dužine geliranja na preživljavanje ćelija. Uticaj ovih parametara analiziran je uz primenu NCI-H460 ćelijske linije. Za dobijanje mikrovlakana korišćena je suspenzija ćelija u 2 mas. % rastvoru Na-alginata (4×10^6 ćel cm^{-3}) i rastvor za geliranje koji sadrži 45 mM Ba^{2+} . Ispitane su dve brzine istiskivanja (umereno i brzo), dva vremena geliranja (1 min i 15 min) i dve veličine igle (25 G i 22 G). Ćelije imobilisane u mikrovlaknima analizirane su odmah po isteku vremena geliranja ili 24 h nakon imobilizacije primenom *Live/Dead* eseja (slika 4.4).



Slika 4.4. Fluorescentne mikrofotografije Ba-alginatnih mikrovlakna sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama. Poređenje mikrovlakna dobijenih pri dve brzine istiskivanja: a) umerenoj i b) brznoj, uz vreme geliranja od 1 min (gornji red) i 15 min (donji red), odmah nakon geliranja i pri korišćenju igle od 25 G. c) Poređenje mikrovlakana dobijenih upotrebom dve različite igle: 25 G (gornji red) i 22 G (donji red), pri umerenoj brzini istiskivanja i nakon 15 min geliranja, 24 h nakon imobilizacije (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 1,4 mm)

Rezultati su pokazali da dužina geliranja i veličina igle imaju zanemarljiv uticaj na vijabilnost ćelija (slika 4.4), ali je zato brzina istiskivanja primetno uticala na preživljavanje ćelija. Nakon brzog istiskivanja, najveći broj ćelija bio je mrtav (slika 4.4b), što je ukazalo na negativne efekte ove brzine istiskivanja na vijabilnost ćelija.

Kako bi se kvantifikovali dobijeni eksperimentalni rezultati, proračunati su režimi strujanja i smicajni naponi u iglama pri umerenoj brzini istiskivanja i velikoj brzini istiskivanja. U eksperimentima su korišćene igle sa ravnim vrhom od 25 G i 22 G, unutrašnjih prečnika 0,26 mm i 0,41 mm, redom, i dužine 10 mm. Eksperimentalno su određeni protoci na osnovu vremena potrebnog za istiskivanje poznate zapremine rastvora i za iglu od 25 G dobijene su vrednosti $0,11 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ i $0,27 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ za umerenu i veliku brzinu istiskivanja, redom, dok su za iglu od 22 G dobijene vrednosti $0,34 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ i $1,0 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$, redom. Za gustinu i viskoznost 2 mas. % rastvora Na-alginata usvojene su vrednosti $1,009 \text{ g cm}^{-3}$ (*Del Gaudio i sar., 2005*) i $156 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (*Davarci i sar., 2017*), redom. Eksperimentalno izmereni protoci (Q) dalje su korišćeni za izračunavanje srednje brzine strujanja suspenzije (v) i Rejnoldsovog broja (Re), a Hagen-Poazejev zakon, koji opisuje karakteristike laminarnog toka u cilindričnoj cevi, korišćen je za izračunavanje pada pritiska ($p_1 - p_2$) i smicajnih napona (τ) u igli. Za proračune su korišćene sledeće jednačine:

$$v = \frac{Q}{A} \quad (4.1)$$

$$Re = \frac{\rho v d}{\mu} \quad (4.2)$$

$$p_1 - p_2 = 32 \frac{\mu v}{d^2} L \quad (4.3)$$

$$\tau = \frac{R}{2} \frac{dp}{dz} \quad (4.4)$$

gde je Q protok, A je površina poprečnog preseka zasnovana na unutrašnjem prečniku igle, ρ je gustina rastvora Na-alginata, d je unutrašnji prečnik igle, μ je viskoznost rastvora Na-alginata, L je dužina igle i R je unutrašnji poluprečnik igle.

U tabeli 4.3 prikazane su dobijene vrednosti srednje brzine strujanja suspenzije, Reynoldsovog broja, pada pritiska i smicajnog napona pri umerenom i brzom istiskivanju sa obe igle, izračunate primenom jednačina 4.1–4.4.

Tabela 4.3. Izračunate vrednosti srednje brzine strujanja suspenzije (v), Reynoldsovog broja (Re), pada pritiska (p_1-p_2) i smicajnog napona (τ) za različite brzine istiskivanja i različite veličine igle prilikom ručnog istiskivanja

<i>Brzina istiskivanja</i>	<i>umereno</i>		<i>brzo</i>	
<i>Veličina igle</i>	<i>25 G</i>	<i>22 G</i>	<i>25 G</i>	<i>22 G</i>
$v, m s^{-1}$	2,1	2,6	5,1	7,5
Re	4	7	9	20
$p_1 - p_2, kPa$	1545,4	753,3	3734,8	2184,7
τ, kPa	10	7,8	24	23

Vrednosti Reynoldsovog broja ≤ 20 dobijene u svim eksperimentalnim serijama ukazuju na laminarni režim strujanja fluida u iglama. Dobijene vrednosti tangencijalnih napona od 10 i 7,8 kPa za umereno istiskivanje, kao i 24 i 23 kPa za brzo istiskivanje, za igle od 25 i 22 G, redom, pokazuju da veličina igle nema značajan uticaj na vrednost tangencijalnih napona. Sa druge strane, brzina istiskivanja dovodi do značajnijih razlika u vrednostima tangencijalnih napona: u igli od 25 G, tangencijalni napon pri brzom istiskivanju je veći 2,4 puta, dok je u igli od 22 G veći 2,9 puta od onog pri umerenom istiskivanju za odgovarajuću iglu. Ovaj rezultat može objasniti uočene negativne efekte na vijabilnost ćelija pri brzom istiskivanju (slika 4.4b).

Prečnik mikrovlakana dobijenih korišćenjem igle od 25 G iznosio je $400 \pm 45 \mu m$, dok je pri upotrebi igle od 22 G bio statistički značajno veći i iznosio $515 \pm 60 \mu m$. Dodatno, analiziran je uticaj brzine istiskivanja i dužine geliranja na vrednosti prečnika dobijenih mikrovlakana. Srednje vrednosti prečnika odmah nakon geliranja prikazane su u tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Prečnici Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama dobijenih pri različitim brzinama istiskivanja i dužinama geliranja kroz iglu od 25 G, mereni odmah po isteku vremena geliranja. Vrednosti prečnika predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

<i>Dužina geliranja (min)</i>	<i>Brzina istiskivanja</i>	
	<i>umereno</i>	<i>brzo</i>
<i>1</i>	$440 \pm 85 \mu m$	$340 \pm 30 \mu m$
<i>15</i>	$355 \pm 15 \mu m$	$285 \pm 25 \mu m$

Brzo istiskivanje dovelo je do formiranja mikrovlakana statistički značajno manjeg prečnika ($\sim 300 \mu m$) u poređenju sa mikrovlaknima dobijenim pri umerenom istiskivanju ($\sim 400 \mu m$). Ovaj rezultat

ukazuje da brzina istiskivanja predstavlja jedan od faktora koji utiče na prečnik formiranih mikrovlakana. Sa druge strane, duže vreme geliranja (15 min) dovelo je do formiranja mikrovlakana statistički značajno manjeg prečnika u poređenju sa mikrovlaknima dobijenim nakon kraćeg vremena geliranja (1 min). Ova razlika može se objasniti izraženijim sinerezisom tokom dužeg geliranja, koji dovodi do skupljanja hidrogela, čime nastaju tanja mikrovlakna nego kod kraćeg vremena geliranja.

Treba napomenuti da su manje vrednosti prečnika mikrovlakana dobijene u ovom eksperimentu (300–400 μm u poređenju sa $\sim 600 \mu\text{m}$, poglavlje 4.1.2.2.) posledica merenja prečnika odmah nakon geliranja jer prilikom gajenja mikrovlakana u medijumu tokom 24 h dolazi do bubrenja, usled čega prečnik raste.

Za dalje eksperimente kao optimalni uslovi izabrani su igla od 25 G, umerena brzina istiskivanja i vreme geliranja od 1 min.

4.2. Optimizacija uslova gajenja ćelija

U drugoj fazi optimizacije ispitivan je uticaj uslova gajenja na maligne ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknima. Ćelije su gajene u statičnim ili protočnim uslovima, pri čemu su ispitane različite kombinacije trajanja kultura. Dodatno, analiziran je uticaj različitih vrednosti protoka, odnosno površinske brzine kojoj su ćelije izložene u protočnim uslovima, kao i različitih početnih koncentracija ćelija u mikrovlaknima. Uticaj navedenih parametara na vijabilnost i proliferaciju ćelija analiziran je brojanjem ćelija, MTT testom i *Live/Dead* esejem. Matematičko modelovanje prenosa mase u statičnim i protočnim uslovima korišćeno je kako bi se objasnili eksperimentalni rezultati.

4.2.1. Ispitivanje uticaja hidrodinamičkih uslova gajenja ćelija na 3D kulture C6 ćelijske linije u Ca-alginatnim mikrovlaknima

U cilju ispitivanja uticaja hidrodinamičkih uslova na vijabilnost i proliferaciju ćelija tokom dužih kultura, C6 ćelije imobilisane u Ca-alginatnim mikrovlaknima gajene su u statičnim uslovima i u uslovima kontinualnog protoka u protočnom bioreaktoru. Uticaj hidrodinamičkih uslova na ćelije ispitan je u dve eksperimentalne serije: 1) 1 dan gajenja u statičnim uslovima, a zatim 5 dana pri kontinualnom protoku u protočnom bioreaktoru, pri površinskoj brzini od 40 i 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ (prva eksperimentalna serija) i 2) 8 dana gajenja u statičnim uslovima, a zatim 5 dana pri kontinualnom protoku u protočnom bioreaktoru, pri površinskoj brzini od 40 i 100 $\mu\text{m s}^{-1}$ (druga eksperimentalna serija). U okviru različitih režima gajenja ispitan je uticaj različite početne koncentracije ćelija u mikrovlaknima ($1,2\text{--}7,3 \times 10^6$ ćelija g^{-1}), kao i različitih vrednosti protoka medijuma u bioreaktorskom sistemu (0,12 i 0,30 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, odnosno površinske brzine 40 i 100 $\mu\text{m s}^{-1}$, redom). Metabolička aktivnost ćelija nakon imobilizacije, kao i nakon gajenja, potvrđena je MTT testom, a koncentracija ćelija u mikrovlaknima određena je brojanjem ćelija. Dobijeni rezultati u prvoj eksperimentalnoj seriji prikazani su u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Početne i krajnje koncentracije C6 ćelija u Ca-alginatnim mikrovlaknima u prvoj eksperimentalnoj seriji, gde su mikrovlakna posle 1 dana u statičnoj kulturi podvrgnuta različitim površinskim brzinama medijuma u protočnom bioreктору u toku 5 dana. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

<i>Početna koncentracija ćelija ($\times 10^6$ ćel g^{-1})</i>		<i>Režim u toku 5 dana</i>	<i>Finalna koncentracija ćelija ($\times 10^6$ ćel g^{-1})</i>
1.	$1,2 \pm 0,2$	površinska brzina $40 \mu m s^{-1}$	$0,6 \pm 0,3$
		površinska brzina $100 \mu m s^{-1}$	$0,3 \pm 0,03$
		kontrola: statična kultura	$1,8 \pm 0,4$
2.	$2,5 \pm 0,3$	površinska brzina $40 \mu m s^{-1}$	$7,1 \pm 0,5$
		površinska brzina $100 \mu m s^{-1}$	Eksp.1 $3,7 \pm 0,7$
			Eksp. 2 $8,0 \pm 1,1$
		kontrola: statična kultura	Eksp.1 $6,2 \pm 0,8$
			Eksp. 2 $6,9 \pm 0,6$
3.	$7,3 \pm 0,9$	površinska brzina $100 \mu m s^{-1}$	$6,1 \pm 1,4$
		kontrola: statična kultura	$16,0 \pm 2,2$

Analizom dobijenih vrednosti koncentracija ćelija može se zaključiti da početna koncentracija ćelija od $1,2 \times 10^6$ ćel g^{-1} nije dovoljna da podrži preživljavanje i proliferaciju ćelija u mikrovlaknima. Ovaj rezultat navodi na zaključak da postoji kritična minimalna koncentracija ćelija koja je neophodna kako bi ćelije mogle da ostvare međusobne interakcije i proliferišu. Pri većim početnim koncentracijama ćelija ($2,5$ i $7,3 \times 10^6$ ćel g^{-1}) može se uočiti da je nakon 5 dana gajenja u kontrolnim mikrovlaknima u statičnim uslovima koncentracija ćelija porasla $\sim 2,5$ puta, što navodi na zaključak da je ćelijska kultura u mikrovlaknima podržana u statičnim uslovima. Sa druge strane, gajenje ćelija u uslovima kontinualnog protoka je u pojedinim eksperimentima imalo pozitivan efekat na proliferaciju ćelija, dok je u drugim imalo negativan efekat ili nije imalo značajan efekat. Posebno je zapažen negativan uticaj pri većoj površinskoj brzini od $100 \mu m s^{-1}$.

U drugoj eksperimentalnoj seriji ispitana je hipoteza da je za dugoročnu kulturu povoljno da se ćelije prilagode okruženju u Ca-alginatnim mikrovlaknima u 3D statičnim uslovima gajenja, a zatim da se prenos mase poboljša uvođenjem kontinualnog protoka. C6 ćelije imobilisane u Ca-alginatnim mikrovlaknima su stoga gajene 8 dana u statičnim uslovima, a zatim još 5 dana u uslovima kontinualnog protoka, pri površinskoj brzini od 40 i $100 \mu m s^{-1}$. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Početne i krajnje koncentracije C6 ćelija u Ca-alginatnim mikrovlaknima u drugoj eksperimentalnoj seriji, gde su mikrovlakna posle 8 dana u statičnoj kulturi podvrgnuta različitim površinskim brzinama medijuma u protočnom bioreaktoru u toku 5 dana. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

	<i>Početna koncentracija ćelija ($\times 10^6$ ćel g⁻¹)</i>	<i>Koncentracija ćelija nakon 8 dana u statičnim uslovima ($\times 10^6$ ćel g⁻¹)</i>	<i>Režim u toku 5 dana</i>	<i>Finalna koncentracija ćelija ($\times 10^6$ ćel g⁻¹)</i>
1.	1,2 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,5	površinska brzina 40 $\mu\text{m s}^{-1}$	4,4 $\pm$ 0,8
			kontrola: statična kultura	2,6 $\pm$ 0,05
2.	2,5	1,5	površinska brzina 100 $\mu\text{m s}^{-1}$	8,8
			kontrola: statična kultura	1,7
3.	2,5 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,4	površinska brzina 100 $\mu\text{m s}^{-1}$	5,7 $\pm$ 0,8
			kontrola: statična kultura	3,5 $\pm$ 0,3

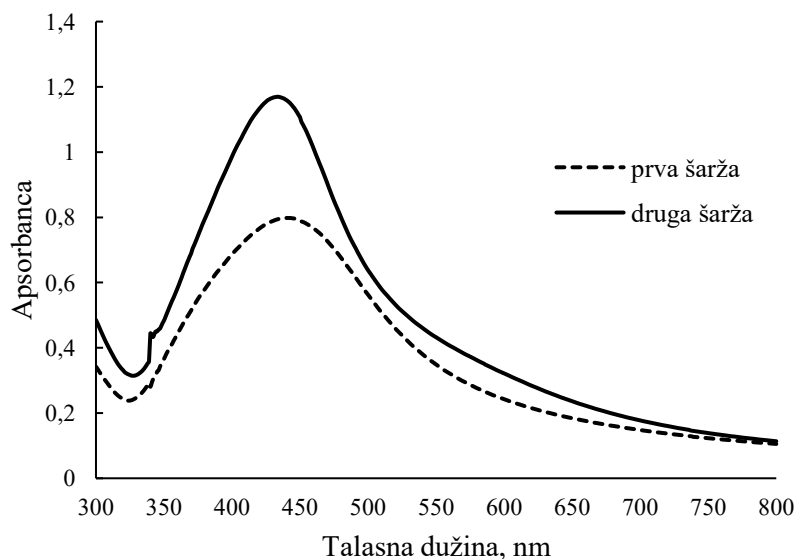
Dobijeni rezultati, iako ne sasvim dosledni, ukazali su da tokom dužih kultura (do 13 dana) bolji prenos mase u uslovima kontinualnog protoka podržava proliferaciju ćelija, odnosno da statični uslovi podržavaju kulture do 8 dana, nakon čega je potrebno korišćenje protočnog bioreaktora. Pretpostavljeno je da je tokom dužih kultura u statičnim uslovima ograničen prenos neke hranljive materije ili bioaktivnog molekula. Kako bi se ispitala ova pretpostavka, prenos mase je matematički modelovan za kiseonik kao mali molekul i za transferin, protein plazme prisutan i u goveđem fetalnom serumu, kao veći bioaktivni molekul.

4.2.1.1. Matematičko modelovanje prenosa mase u protočnom bioreaktoru

Prethodna istraživanja pokazala su da pri protoku fluida kroz pakovani sloj Ca-alginatnih mikročestica sa nanočesticama srebra deo fluida prolazi kroz sam hidrogel. Kako bi se kvantitativno odredila brzina strujanja fluida kroz Ca-alginatni hidrogel u pakovanom sloju mikrovlakana, prvo je eksperimentalno ispitano, a zatim i matematički modelovano otpuštanje srebra iz Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom. Cilj je bio da se tako dobijena intersticijalna brzina strujanja zatim primeni u modelovanju prenosa mase u Ca-alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim ćelijama.

4.2.1.1.1. Matematičko modelovanje otpuštanja srebra iz Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom

Ca-alginatna mikrovlakna sa nanočesticama srebra i medom dobijena su u dve različite šarže, prečnika ($670 \pm 140 \mu\text{m}$) i koncentracije srebra ($2,9 \pm 0,4 \text{ mM}$), određene primenom AAS. Pored toga, prisustvo nanočestica srebra u Ca-alginatnim mikrovlaknima je potvrđeno UV-vidljivom spektroskopijom (slika 4.5).

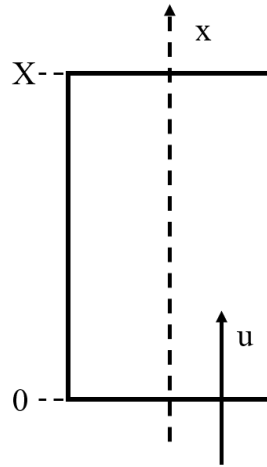


Slika 4.5. UV-vidljivi spektri dve šarže Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom nakon rastvaranja ($n=3$ za svaku šaržu; standardne devijacije ($\leq 4\%$) su izostavljene sa grafika radi preglednosti)

Na slici se može uočiti da apsorpcioni spektri rastvora Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom pokazuju maksimum apsorbanca na talasnoj dužini od 441 i 433 nm za prvu i drugu šaržu, redom, što potvrđuje prisustvo nanočestica srebra u mikrovlaknima (*Stojkowska i sar., 2019*). Mikrovlakna su zatim podvrgnuta kontinualnom protoku pri površinskoj brzini od $80 \mu\text{m s}^{-1}$ u protočnom bioreaktoru i određene su koncentracije otpuštenog srebra u medijumu u toku 7 dana. Otpuštanje srebra prvo je modelovano Fikovim zakonom difuzije, ali ovaj model nije pokazao slaganje sa eksperimentalnim podacima. Stoga je u narednom koraku primenjen difuziono-advekcioni model. Pakovani sloj nanokompozitnih mikrovlakana modelovan je kao kompaktni cilindar hidrogela dužine 3 cm (na osnovu eksperimentalno izmerene visine pakovanog sloja). Pretpostavljeno je da je oksidacija nanočestica srebra brža od prenosa mase srebra kroz hidrogel, tako da je promena koncentracije srebra, c_s , u cilindričnom hidrogelu tokom vremena opisana difuziono-advekcijom jednačinom u aksijalnom pravcu, x :

$$\frac{\partial c_s}{\partial t} = D_s \left(\frac{\partial^2 c_s}{\partial x^2} \right) - u \frac{\partial c_s}{\partial x} \quad (4.5)$$

gde je D_s prividni koeficijent difuzije srebra (nanočestica, jona Ag^+ i nastalih $\text{AgCl}_x^{(x-1)-}$) u alginatnom hidrogelu koji je usvojen kao $2,1 \times 10^{-15} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (*Kostić i sar., 2016*), a u je brzina medijuma kroz hidrogel (slika 4.6).



Slika 4.6. Šematski prikaz geometrije i parametara modela prenosa mase kroz kompaktni cilindar hidrogela nanokompozitnih mikrovlakana

Koncentracija srebra u medijumu, c_{sm} , je u svakoj vremenskoj tački računata kao:

$$c_{sm} = \frac{V (c_{s0} - \langle c_s \rangle)}{V_m} \quad (4.6)$$

gde je c_{s0} početna koncentracija srebra u mikrovlaknima ($2,9 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), $\langle c_s \rangle$ je srednja vrednost koncentracije srebra u hidrogelu, V je zapremina hidrogela (izračunata kao $0,49 \text{ cm}^3$ na osnovu mase mikrovlakana i gustine Ca-alginatnog hidrogela od 1020 kg m^{-3} (Kostić i sar., 2016), a V_m je zapremina medijuma (15 cm^3).

Srednja vrednost koncentracije nanočestica srebra $\langle c_s \rangle$ u svakoj vremenskoj tački računata je integraljenjem:

$$\langle c_s \rangle = \frac{1}{X} \int_0^X c_s(x) dx \quad (4.7)$$

gde je X visina hidrogela ($X = 3 \text{ cm}$).

Za početne uslove usvojeno je da je koncentracija nanočestica srebra u hidrogelu uniformna, dok je u medijumu jednaka nuli:

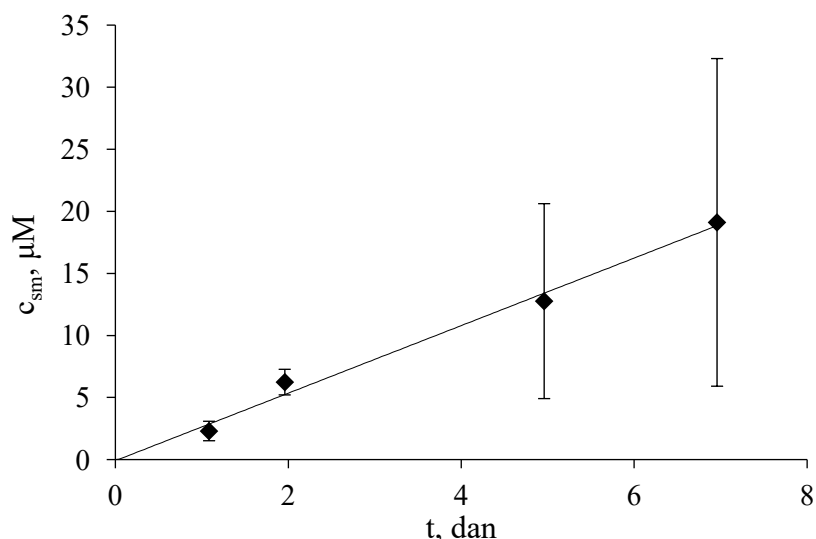
$$\begin{aligned} t = 0 \quad c_s &= c_o & 0 < x < X \\ c_m &= 0 \end{aligned} \quad (4.8)$$

Pretpostavljeno je da je koncentracija srebra u medijumu zanemarljivo mala u poređenju sa onom u hidrogelu, pa je za koncentraciju srebra na ulazu uzeta vrednost $c = 0$, dok je na izlazu postavljen Nojmanov granični uslov:

$$\frac{\partial c_s}{\partial x} = 0 \text{ za } x = X \quad (4.9)$$

Jednačine 4.5–4.7 rešene su numerički simultano, pri čemu je drugi izvod koncentracije rešen metodom centralnih konačnih razlika, a prvi izvod metodom zadnjih konačnih razlika.

Numeričkim rešavanjem jednačina modela dobijene su vrednosti koje su pokazale dobro slaganje sa eksperimentalno izmerenim koncentracijama srebra u medijumu (slika 4.7).



Slika 4.7. Koncentracija srebra otpuštenog iz Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom (c_{sm}) u zavisnosti od vremena (t) u uslovima kontinualnog protoka: eksperimentalni podaci (simboli) i rezultati modelovanja (linija). Eksperimentalne vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija ($n=3$).

Treba napomenuti da su velike standardne devijacije u kasnijim danima otpuštanja srebra posledica većeg taloženja AgCl u sistemu u tom periodu, što je dovelo do rasipanja eksperimentalno izmerenih vrednosti. Dobijeno je da modelom predviđena vrednost intersticijalne brzine medijuma unutar hidrogela iznosi $10,2 \text{ nm s}^{-1}$.

4.2.1.1.2. Matematičko modelovanje prenosa mase kroz mikrovlakno sa imobilisanim ćelijama

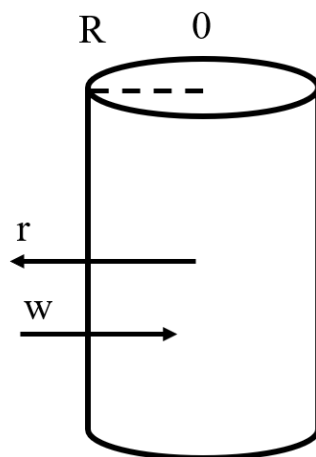
Na osnovu dobijenih rezultata modelovanja otpuštanja srebra iz pakovanog sloja Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom u uslovima kontinualnog protoka, postavljen je model za opisivanje prenosa mase kroz jedno mikrovlakno sa imobilisanim ćelijama. Model je zasnovan na difuziji, advekciji i reakciji u slučaju postojanja protoka medijuma, odnosno na difuziji i reakciji u slučaju statične kulture. U oba slučaja, pretpostavke modela bile su sledeće:

1. cilindrična geometrija mikrovlakna;
2. konstantan prečnik mikrovlakna;
3. konstantna potrošnja modelovane supstance po ćeliji (hemijska reakcija nultog reda);
4. konstantna koncentracija modelovane supstance u medijumu, pa samim tim i na površini mikrovlakna;
5. prenos mase samo u radijalnom pravcu.

Na taj način je prenos mase u mikrovlaknu u protočnim uslovima opisan difuziono-advekciono-reakcionom jednačinom:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{D}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) - w \frac{\partial c}{\partial r} - \rho q \quad (4.10)$$

gde D predstavlja koeficijent difuzije modelovane supstance, r predstavlja radijalno rastojanje od centra mikrovlakna, w predstavlja intersticijalnu brzinu medijuma unutar mikrovlakna u radijalnom pravcu, ρ predstavlja zapreminsku koncentraciju ćelija, a q predstavlja potrošnju po ćeliji (slika 4.8).



Slika 4.8. Šematski prikaz geometrije i parametara modela prenosa mase kroz mikrovlakno

Ista jednačina bez advektivnog člana korišćena je za opisivanje prenosa mase u mikrovlaknima u statičkim uslovima:

$$\frac{c}{\partial t} = \frac{D}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) - \rho q \quad (4.11)$$

Početni i granični uslovi

Početni uslovi zavisili su od modelovane supstance. Za kiseonik, uzeto je da je početna koncentracija uniformna kroz celo mikrovlakno i jednaka onoj u medijumu (c_m):

$$t = 0 \quad 0 \leq r \leq R \quad c = c_m \quad (4.12)$$

gde je R poluprečnik mikrovlakana. Za transferin ili drugu limitirajuću supstancu prisutnu u medijumu za početnu koncentraciju u mikrovlaknima uzeta je vrednost 0:

$$t = 0 \quad 0 \leq r \leq R \quad c = 0 \quad (4.13)$$

Uslov simetrije postavljen je u osi mikrovlakna:

$$t > 0 \quad r = 0 \quad \frac{\partial c}{\partial r} = 0 \quad (4.14)$$

Na spoljašnjoj granici mikrovlakna, pri vrednosti poluprečnika R , pretpostavljena je konstantna koncentracija, jednaka onoj u medijumu (c_m):

$$t > 0 \quad r = R \quad c = c_m \quad (4.15)$$

Numeričko rešenje

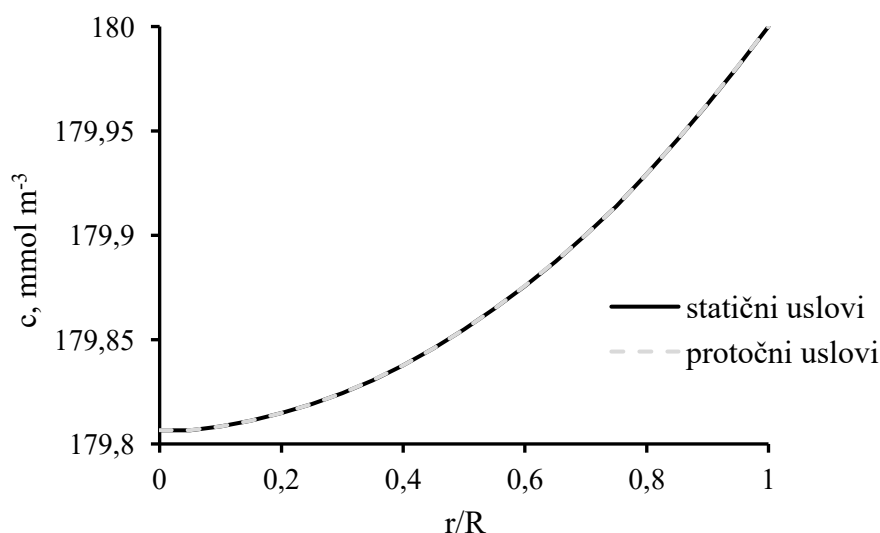
Parcijalne diferencijalne jednačine (4.10) i (4.11) rešene su numerički. Model je prvo razvijen korišćenjem funkcije *pdepe* u programu *MATLAB R2018a* (MathWorks Inc., SAD), međutim, nije pokazao stabilnost u celokupnom ispitivanom opsegu vrednosti koeficijenta difuzije (D). Stoga je razvijen model u programu *Microsoft Excel* (Microsoft Office PRO Plus 2016). Drugi izvod koncentracije rešen je metodom centralnih konačnih razlika, a prvi izvod metodom prednjih i zadnjih konačnih razlika.

Usvojene su sledeće vrednosti parametara modela. Za prečnik mikrovlakana (d), usvojena je vrednost od 540 μm , što predstavlja srednju vrednost svih izmerenih prečnika Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim C6 ćelijama pre i nakon gajenja u statičnim i protočnim uslovima. Vrednost intersticijalne brzine medijuma u mikrovlaknima u uslovima protoka (w) usvojena je kao 10,2 nm s^{-1} , na osnovu eksperimentalnih rezultata i matematičkog modelovanja otpuštanja srebra iz nanokompozitnih Ca-alginatnih mikrovlakana sa nanočesticama srebra i medom. Gustina ćelija je

usvojena kao $1,5 \times 10^6$ ćel g^{-1} , na osnovu početne koncentracije u drugom eksperimentu u drugoj eksperimentalnoj seriji (tabela 4.6).

4.2.1.1.2.1. Matematičko modelovanje prenosa kiseonika

Za modelovanje prenosa kiseonika usvojeni su sledeći parametri. Za koeficijent difuzije kiseonika (D) usvojena je vrednost od $1,79 \times 10^{-9} m^2 s^{-1}$, na osnovu literaturno dostupnog podatka za koeficijent difuzije kiseonika u 3 mas. % Ca-alginatnom hidrogelu (Hulst i sar., 1989). Za koncentraciju kiseonika u medijumu (c_m) uzeta je vrednost od $0,18 mol m^{-3}$ (Place i sar., 2017). Za potrošnju kiseonika po ćeliji (q) usvojena je vrednost iz literature za C6 ćelijsku liniju od $12 \times 10^{-18} mol s^{-1} ćel^{-1}$ (Wagner i sar., 2011). Matematički model je rešen primenom koraka $\Delta r = 13,5 \mu m$ i $\Delta t = 0,01 s$. U oba slučaja, stacionarno stanje je postignuto gotovo odmah (nakon 73 s i 63 s u statičnim i protočnim uslovima, redom), a koncentracija kiseonika u osi mikrovlakana iznosila je 99,9 % koncentracije kiseonika u medijumu. Profili koncentracija kiseonika nakon dostizanja stacionarnog stanja u mikrovlaknima prikazani su kao funkcija normalizovanog radijalnog rastojanja u odnosu na poluprečnik mikrovlakana (slika 4.9).

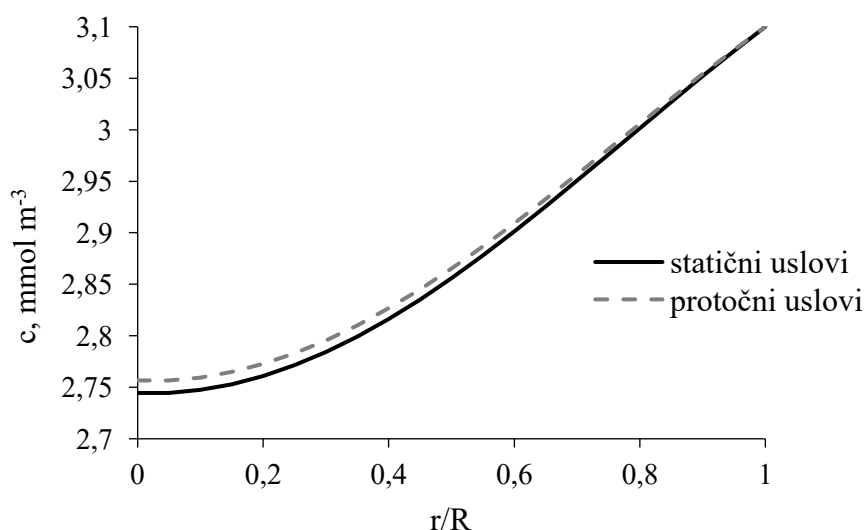


Slika 4.9. Profili koncentracije kiseonika (c) u Ca-alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim ćelijama kao funkcija normalizovanog radijalnog rastojanja u mikrovlaknu (r/R) nakon postizanja stacionarnog stanja u uslovima kontinualnog protoka u bioreaktorskoj kulturi i u statičnim uslovima pri početnoj koncentraciji ćelija od $1,5 \times 10^6$ ćelija g^{-1} (R je poluprečnik mikrovlakna; $r/R = 0$ označava osu mikrovlakna, dok $r/R = 1$ označava spoljašnju površinu mikrovlakna).

Dobijeni rezultati ukazali su na efikasan prenos kiseonika i u uslovima kontinualnog protoka u bioreaktoru i u statičnim uslovima, pri čemu je difuzija dovoljna da zadovolji potrebu imobilisanih ćelija za kiseonikom pri datoj gustini, bez pojave hipoksičnih regiona. Dodatno, modelovana je difuzija kiseonika unutar mikrovlakna pri finalnoj koncentraciji ćelija u mikrovlaknima od $8,8 \times 10^6$ ćelija g^{-1} , što je bila najveća dobijena koncentracija ćelija u drugoj ekseprimentalnoj seriji (tabela 4.6) i pokazano je da je i u ovom slučaju prenos difuzijom dovoljan, bez uočljivog doprinosa advekcije. Pri koncentraciji ćelija od $8,8 \times 10^6$ ćelija g^{-1} , stacionarno stanje bi se postiglo nakon 82 s u statičnim uslovima i 78 s u protočnom bioreaktoru, a koncentracija kiseonika u osi mikrovlakana bi iznosila 99,4 % koncentracije kiseonika u medijumu. Stoga se može pretpostaviti da statični uslovi omogućavaju efikasan prenos gasova i malih molekula sa koeficijntom difuzije reda veličine $10^{-9} m^2 s^{-1}$ do ćelija imoblisanih u mikrovlaknima pri ispitivanom opsegu koncentracije ćelija do $\sim 9 \times 10^6$ ćel g^{-1} i da je doprinos protoka prenosu mase u ovom slučaju zanemarljiv.

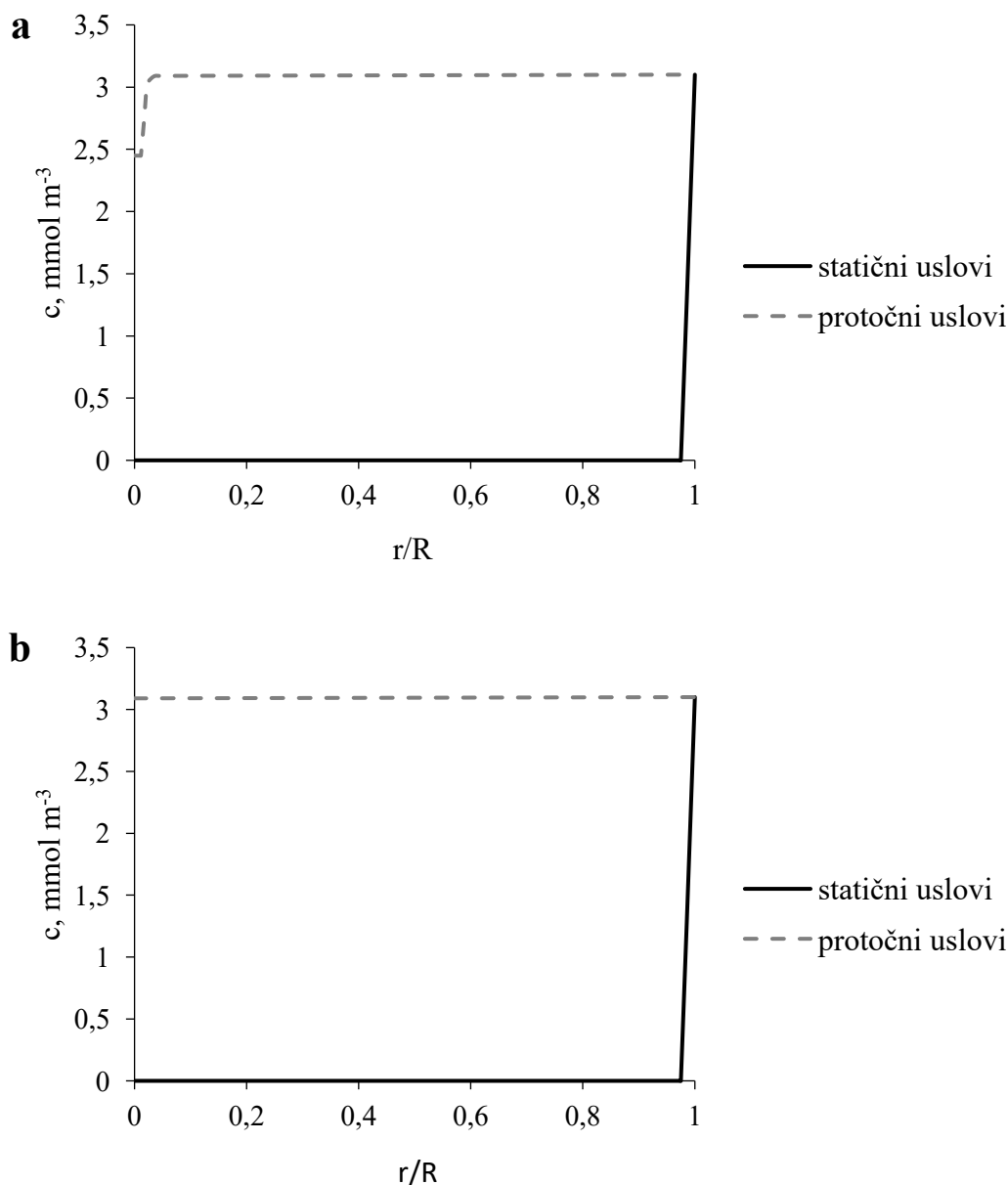
4.2.1.1.2.2. Matematičko modelovanje prenosa transferina

Za modelovanje prenosa transferina usvojeni su sledeći parametri. Za koeficijent difuzije transferina (D) usvojena je vrednost koeficijenta difuzije određena za agarozni gel od $5,3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Zadro i sar., 1981), dok je za potrošnju transferina (q) usvojena vrednost od $2,6 \times 10^{-22} \text{ mol s}^{-1} \text{ ćelija}^{-1}$ (Ciechanover i sar., 1983). Za početnu koncentraciju transferina uzeta je u obzir prosečna koncentracija transferina u goveđem fetalnom serumu od $2,5 \text{ mg cm}^{-3}$ koji je razblažen u medijumu 10 puta, pa je za modelovanje usvojena koncentracija transferina u medijumu (c_m) od $3,1 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$. Matematički model je rešen primenom koraka $\Delta r = 13,5 \text{ } \mu\text{m}$ i $\Delta t = 0,5 \text{ s}$. Numeričkim rešavanjem jednačina (4.10) i (4.11) dobijeno je da se stacionarno stanje u statičnim i protočnim uslovima postiže nakon 36,2 min i 35,7 min, redom, a da koncentracija transferina u osi mikrovlakana dostiže 99,98 % koncentracije transferina u medijumu. Na slici 4.10 su prikazani profili koncentracije transferina nakon 10 min u obe kulture kako bi se mogle uočiti male razlike u brzini prenosa pre dostizanja stacionarnog stanja.



Slika 4.10. Profil koncentracije transferina (c) u Ca-alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim ćelijama kao funkcija normalizovanog radijalnog rastojanja u mikrovlaknu (r/R) nakon 10 min u uslovima kontinualnog protoka u bioreaktorskoj kulturi i u statičnim uslovima (R je poluprečnik mikrovlakana; $r/R = 0$ označava osu mikrovlakana, dok $r/R = 1$ označava spoljašnju površinu mikrovlakana)

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da, slično kao i u slučaju sa kiseonikom, statični uslovi omogućavaju efikasan prenos transferina i da je doprinos advekcije u prenosu mase zanemarljiv. Ipak, treba uzeti u obzir da transferin može da interaguje sa COO^- grupama (Aisen i sar., 1980) koje su prisutne u alginatnim lancima, što može da uspori difuziju transferina kroz alginatni hidrogel, odnosno da utiče na koeficijent difuzije smanjujući mu vrednost u odnosu na onu korišćenu za modelovanje. S obzirom na tu činjenicu, kao i rezultat da je u određenim kulturama eksperimentalno uočen povoljan uticaj protoka, modelovan je prenos transferina uz značajno manju vrednost koeficijenta difuzije od $1 \times 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (slika 4.11).

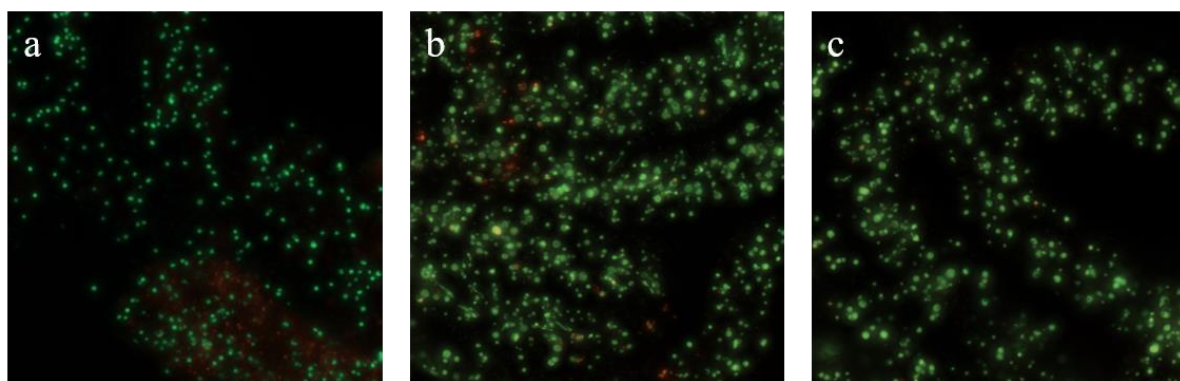


Slika 4.11. Profili koncentracije transferina (c) u Ca-alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim ćelijama kao funkcija normalizovanog radijalnog rastojanja u mikrovlaknu (r/R) u uslovima kontinualnog protoka u biorektorskoj kulturi i u statičnim uslovima, uz prividni koeficijent difuzije (D) od $1 \cdot 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$: a) nakon 7 h; b) nakon 5 dana gajenja (R je poluprečnik mikrovlakna; $r/R = 0$ označava osu mikrovlakna, dok $r/R = 1$ označava spoljašnju površinu mikrovlakna)

U ovom slučaju advekcija se pokazala kao dominantan mehanizam prenosa mase kroz mikrovlakna u biorektorskoj kulturi. Koncentracija transferina u alginatnim mikrovlaknima u statičnim uslovima ostala je jednaka nuli tokom 5 dana gajenja usled približnih brzina difuzije i potrošnje (slika 4.11b). Sa druge strane, koncentracija transferina u mikrovlaknima u biorektorskoj kulturi je skoro dostigla koncentraciju transferina u medijumu nakon 7 h gajenja (slika 4.11a). Dobijeni rezultati ukazuju da je moguće da prenos određenih molekula kroz mikrovlakna u statičnim uslovima može da bude nedovoljan ukoliko je koeficijent difuzije mali, reda veličine $10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Stoga, advekcija u protočnim biorektorskim kulturama može da nadomesti difuziona ograničenja.

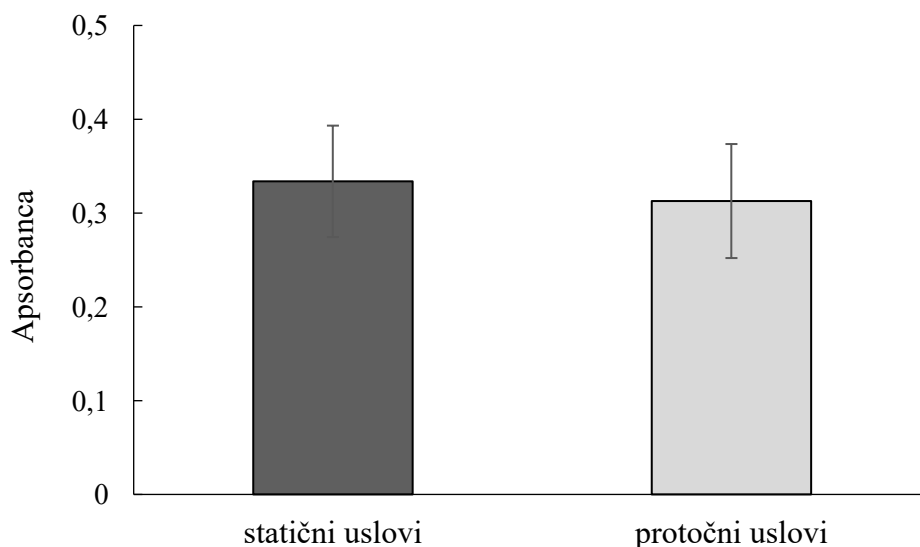
4.2.2. Ispitivanje uticaja hidrodinamičkih uslova gajenja ćelija na 3D kulture NCI-H460 ćelijske linije u Ba-alginatnim mikrovlaknima

Kako bi se ispitao uticaj hidrodinamičkih uslova na vijabilnost i metaboličku aktivnost NCI-H460 ćelija imobilisanih u Ba-alginatnim mikrovlaknima, ćelije su gajene u statičnim uslovima, a zatim u protočnom bioreктору sa kontinualnim protokom medijuma. Nakon 24 h statičnog gajenja, mikrovlakna su prebačena u protočni bioreaktor i održavana 3 dana pri protoku medijuma od $0,30 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ i površinskoj brzini od $100 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$. Imobilisane ćelije gajene 4 dana u statičnim uslovima služile su kao kontrola. Eksperiment je izveden u 2 eksperimentalne serije, pri čemu je koncentracija ćelija u mikrovlaknima iznosila $4 \times 10^6 \text{ } \text{ćel cm}^{-3}$, dok su korišćene 2 koncentracije rastvora Na-alginata u suspenziji: 1,6 i 2 mas. %. U prvoj eksperimentalnoj seriji dobijena su mikrovlakna prečnika $380 \pm 55 \text{ } \mu\text{m}$, a vijabilnost ćelija potvrđena je pomoću *Live/Dead* esej (slika 4.12.)



Slika 4.12. Fluorescentne mikrofotografije Ba-alginatnih mikrovlakna sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama (1,6 mas. % Na-alginat, $4 \times 10^6 \text{ } \text{ćel cm}^{-3}$) : a) 24 h nakon imobilizacije; b) nakon 4 dana u statičnim uslovima; c) nakon 24 h u statičnim uslovima i 3 dana u uslovima kontinualnog protoka (površinska brzina $100 \text{ } \mu\text{m s}^{-1}$) (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno))

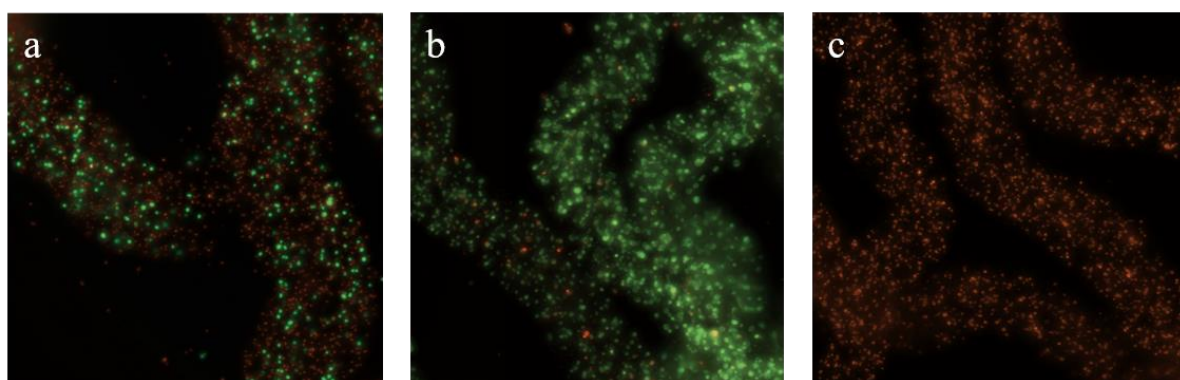
Sa slike se može uočiti da su imobilisane ćelije i nakon gajenja u statičnim uslovima i nakon gajenja u uslovima kontinualnog protoka uglavnom žive (slika 4.12b, c). Metabolička aktivnost ćelija kvantifikovana je pomoću MTT testa (slika 4.13).



Slika 4.13. Metabolička aktivnost NCI-H460 ćelija imobilisanih u Ba-alginatnim mikrovlaknima i gajenih u statičnim uslovima (4 dana) i protočnim uslovima (24 h u statičnim, a zatim 3 dana u uslovima kontinualnog protoka pri površinskoj brzini od $100 \mu\text{m s}^{-1}$) izražena kao razlika između apsorbaneci MTT rastvora na 570 i 690 nm ($A_{570} - A_{690}$). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost 8 merenja).

Rezultati MTT testa pokazali su da nema statistički značajne razlike u metaboličkoj aktivnosti između imobilisanih ćelija gajenih u obe kulture (slika 4.13). Dodatno, vrednosti prečnika mikrovlakana nisu bile statistički značajno različite i iznosile su $380 \pm 55 \mu\text{m}$, $395 \pm 60 \mu\text{m}$ i $370 \pm 45 \mu\text{m}$ za mikrovlakna 24 h nakon imobilizacije, nakon gajenja u statičnim uslovima i u uslovima kontinualnog protoka, redom.

U drugoj eksperimentalnoj seriji, kada je korišćen rastvor Na-alginata koncentracije 2 mas. %, dobijena su mikrovlakna prečnika $420 \pm 25 \mu\text{m}$, a vijabilnost ćelija potvrđena je pomoću *Live/Dead* eseja (slika 4.14).



Slika 4.14. Fluorescentne mikrofotografije Ba-alginatnih mikrovlakna sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama (2 mas. % Na-alginat, 4×10^6 ćel cm^{-3}): a) 24 h nakon imobilizacije; b) nakon 4 dana u statičnim uslovima; c) nakon 24 h u statičnim uslovima i 3 dana u uslovima kontinualnog protoka (površinska brzina $100 \mu\text{m s}^{-1}$) (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno))

Sa slike se može uočiti da su imobilisane ćelije gajene u statičnim uslovima pretežno žive, dok su one gajene u protočnim uslovima sve mrtve (slika 4.14b, c). Treba napomenuti da je u ovoj eksperimentalnoj seriji primećen značajan broj mrtvih ćelija 24 h nakon imobilizacije (slika 4.14a), što je uticalo na dalje preživljavanje ćelija. Ćelije gajene u statičnim uslovima uglavnom su uspele da

se oporave, dok ćelije u protočnom bioreaktoru nisu preživele, zbog čega ni kvantitativni MTT test nije rađen.

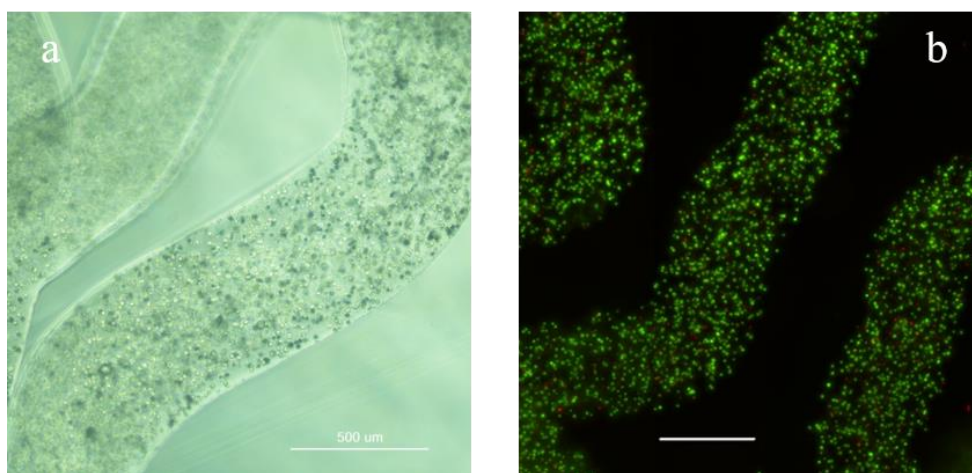
Nakon sprovedenih eksperimenata u protočnim uslovima i njihovog poređenja sa eksperimentima izvedenim u statičnim uslovima zaključeno je da statični uslovi pružaju adekvatnu podršku za 3D kulture malignih ćelija u alginatnim mikrovlaknima, dok uvođenje protočnih uslova nije pokazalo značajan doprinos u odnosu na statične uslove. Uzimajući u obzir i činjenicu da uspostavljanje bioreaktorskih kultura uvodi dodatnu složenost u izvođenje eksperimenata, u narednim eksperimentima ćelije su gajene isključivo u statičnim uslovima.

4.3. Gajenje malignih ćelija u alginatnim mikrovlaknima

Nakon što su izabrani optimalni parametri za dobijanje mikrovlakana sa imobilisanim malignim ćelijama i optimalni uslovi gajenja ćelija, u drugom koraku uspostavljane su kratkotrajne i dugotrajne 3D kulture malignih ćelija u statičnim uslovima. Za potrebe ovog istraživanja, kulture koje su trajale do 7 dana smatrane su kratkotrajnim, dok su one koje su trajale duže od 10 dana smatrane dugotrajnim. U okviru kratkotrajnih kultura, NCI-H460 ćelije su gajene u Ba-alginatnim mikrovlaknima do 7 dana, a u okviru dugotrajnih, U2OS ćelije, HOS sferoidi i HOS ćelije gajeni su u Ca-alginatnim mikrovlaknima do 11, 12 i 21 dana, redom, dok su K7M2-wt ćelije gajene u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima do 21 dana.

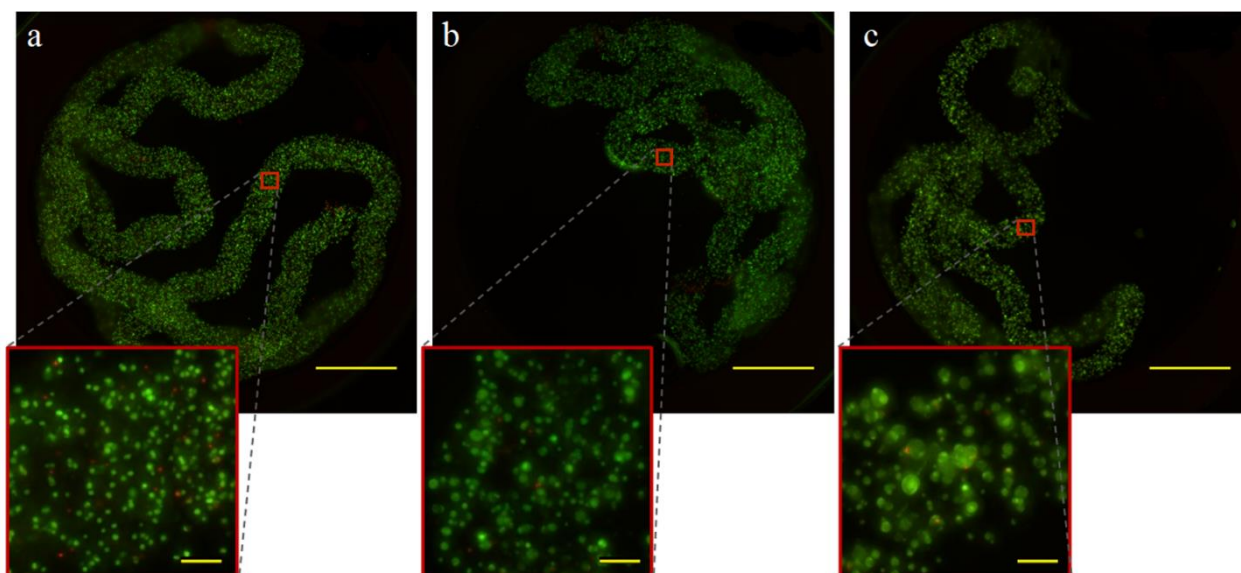
4.3.1. Kratkotrajne kulture NCI-H460 ćelijske linije u Ba-alginatnim mikrovlaknima

Ba-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama, prečnika $\sim 550 \mu\text{m}$, dobijena ručnim istiskivanjem suspenzije ćelija u alginatu (2 mas. % rastvor Na-alginata, $4 \times 10^6 \text{ cel cm}^{-3}$) u rastvor za geliranje koji je sadržao 45 mM Ba^{2+} (slika 4.15), gajena su u statičnim uslovima do 7 dana.



Slika 4.15. Ba-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama 24 h nakon imobilizacije: a) optička mikrofotografija (razmernik = $500 \mu\text{m}$); b) fluorescentna mikrofotografija (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = $500 \mu\text{m}$)

Na slici se može se uočiti da su pojedinačne ćelije 24 h nakon imobilizacije dominantno žive i uniformno raspoređene po celoj zapremini mikrovlakana. Vijabilnost imobilisanih ćelija je praćena u toku vremena (1., 4. i 7. dan) pomoću *Live/Dead* esaja (slika 4.16). Tokom kratkotrajnog gajenja ćelija do 7 dana u Ba-alginatnim mikrovlaknima ćelije su ostale žive, zadržale su sposobnost proliferacije, a pojedinačne ćelije su spontano formirale agregate (slika 4.16).

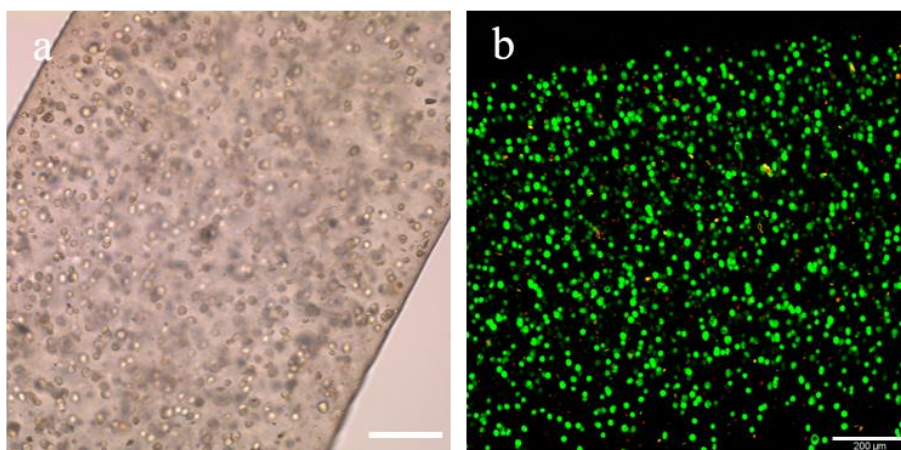


Slika 4.16. Fluorescentne mikrofotografije Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama a) 1., b) 4. i c) 7. dana (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 1,4 mm). Delovi mikrovlakana su uveličani kako bi se bolje vizualizovala agregacija ćelija od pojedinačnih ćelija 1. dana do formiranih agregata 7. dana (razmernik = 100 μm).

Prvi agregati uočeni su 4. dana gajenja, a 7. dana jasno su bili uočljivi i sferični i izduženi agregati (slika 4.16b, c). Dobijeni rezultati pokazali su da Ba-alginatna mikrovlakna podržavaju rast NCI-H460 ćelija i spontano formiranje agregata, a žive ćelije prisutne u celoj zapremini mikrovlakana 7. dana potvrdile su da nema difuzionih ograničenja kiseonika i nutrijenata u 3D kulturi.

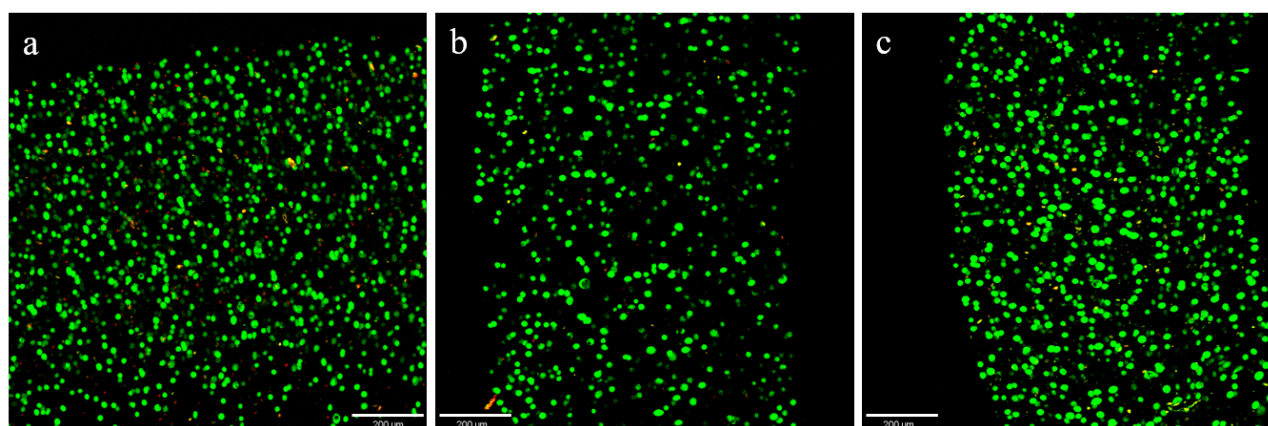
4.3.2. Dugotrajne kulture U2OS ćelijske linije u Ca-alginatnim mikrovlaknima

Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim U2OS ćelijama, prečnika $745 \pm 95 \mu\text{m}$, dobijena ručnim istiskivanjem suspenzije ćelija u alginatu (2,8 mas. % rastvor Na-alginata, 4×10^6 cel cm^{-3}), gajena su u statičnim uslovima do 11 dana. Ćelije su uspešno imobilisane u Ca-alginatna mikrovlakna kao uniformno raspoređene pojedinačne ćelije (slika 4.17). Nakon imobilizacije, skoro sve ćelije su ostale žive, što je potvrđeno pomoću *Live/Dead* esaja (slika 4.17b).



Slika 4.17. Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim U2OS ćelijama 24 h nakon imobilizacije: a) optička mikrofotografija (razmernik = 100 μm) i b) fluorescentna mikrofotografija (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 200 μm)

Nakon 11 dana gajenja u statičnim uslovima, vijabilnost U2OS ćelija imobilisanih u Ca-alginatnim mikrovlaknima procenjena je pomoću *Live/Dead* esejja (slika 4.18).

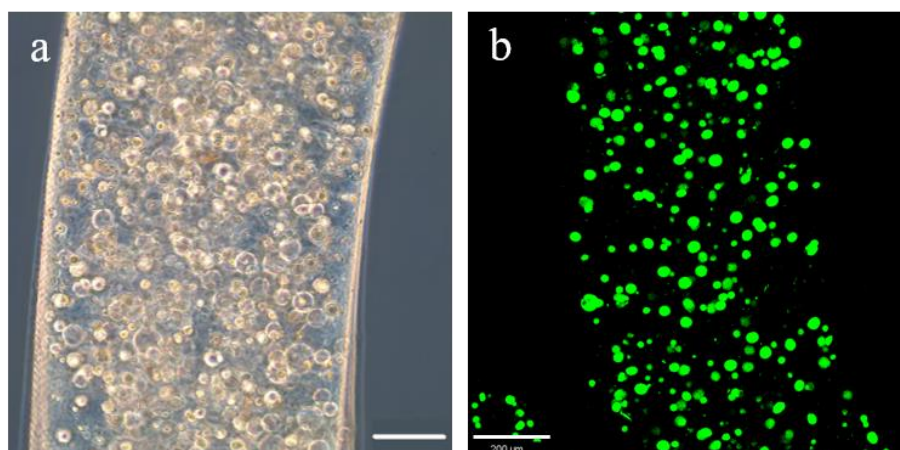


Slika 4.18. Fluorescentne mikrofotografije U2OS ćelija gajenih u Ca-alginatnim mikrovlaknima a) 1., b) 5. i c) 11. dana (*Live/dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 200 µm)

Na slici se može uočiti da su ćelije ostale žive tokom celog perioda gajenja. Takođe, ne uočava se značajna promena u koncentraciji živih ćelija, kao ni porast broja mrtvih ćelija 11. dana u odnosu na 1. i 5. dan. Dobijeni rezultati ukazali su da Ca-alginatna mikrovlakna podržavaju gajenje U2OS ćelijske linije najmanje 11 dana. Takođe, treba napomenuti da u slučaju U2OS ćelija u 3D kulturi nije uočeno formiranje agregata ćelija tokom celokupnog perioda gajenja.

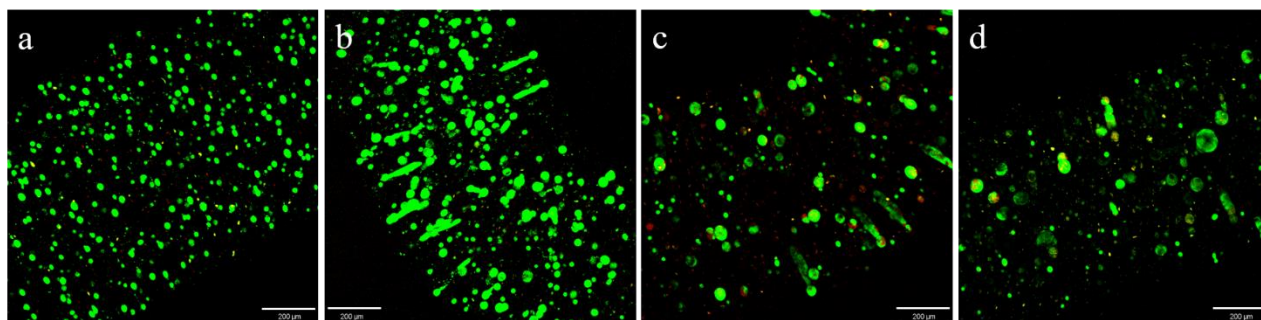
4.3.3. Dugotrajne kulture HOS ćelijske linije u Ca-alginatnim mikrovlaknima

Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim HOS ćelijama, prečnika 640 ± 100 µm, dobijena ručnim istiskivanjem suspenzije ćelija u alginatu (2,8 mas. % rastvor Na-alginata, 4×10^6 cel cm⁻³), gajena su u statičnim uslovima do 21 dana. Ćelije su uspešno imobilisane u Ca-alginatna mikrovlakna kao uniformno raspoređene pojedinačne ćelije (slika 4.19). Nakon imobilizacije, ćelije su ostale žive, što je potvrđeno pomoću *Live/Dead* esejja (slika 4.19b).



Slika 4.19. Ca-alginatna mikrovlakna sa imobilisanim HOS ćelijama 24 h nakon imobilizacije: a) optička mikrofotografija (razmernik = 100 µm) i b) fluorescentna mikrofotografija (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 200 µm)

HOS ćelije su zatim gajene do 21 dana u Ca-alginatnim mikrovlaknima u statičnim uslovima, a vijabilnost ćelija ispitana je pomoću *Live/Dead* esejja (slika 4.20).

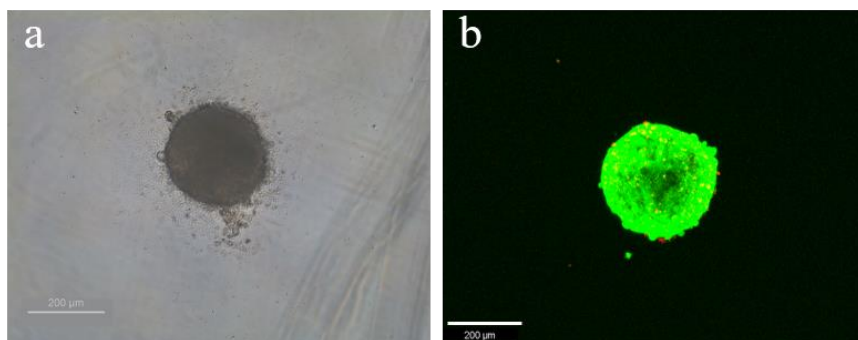


Slika 4.20. Fluorescentne mikrofotografije HOS ćelija gajenih u Ca-alginatnim mikrovlaknima: a) 1., b) 4., c) 11. i d) 21. dana (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 200 µm)

Na slici se može uočiti da su ćelije ostale žive tokom celokupnog vremena gajenja, pri čemu je došlo do smanjenja broja živih ćelija tokom vremena. Do 4. dana ćelije su proliferisale i formirale sferične i izdužene agregate (slika 4.20b), sa živim pojedinačnim ćelijama i ćelijama u agregatima. Nakon toga (11. i 21. dana, slika 4.20c, d) uočeno je znatno smanjenje broja živih pojedinačnih ćelija, ukazujući na to da je većina ćelija preživela isključivo u agregatima tokom dužeg trajanja kultura.

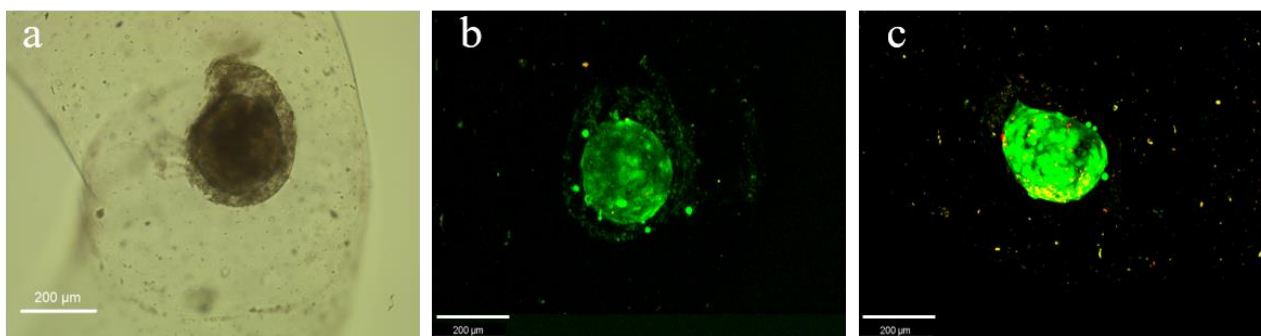
4.3.4. Dugotrajne kulture HOS sferoida u Ca-alginatnim mikrovlaknima

HOS sferoidi srednjeg prečnika ~260 µm uspešno su dobijeni nakon 4 dana gajenja u medijumu, a vijabilnost ćelija je potvrđena pomoću *Live/Dead* eseja (slika 4.21).



Slika 4.21. HOS sferoidi u medijumu nakon 4 dana gajenja: a) optička mikrofotografija (razmernik = 200 µm) i b) fluorescentna mikrofotografija (*Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 200 µm)

Dobijeni sferoidi su zatim suspendovani u 2,8 mas. % rastvoru Na-alginata ($180 \text{ sferoida cm}^{-3}$) i ručno istiskivani u rastvor 180 mM Ca^{2+} tako da su dobijena mikrovlakna sa imobilisanim sferoidima. Mikrovlakna su zatim gajena u statičnim uslovima do 12 dana, a vijabilnost ćelija u sferoidima ispitana je pomoću *Live/Dead* eseja (slika 4.22).

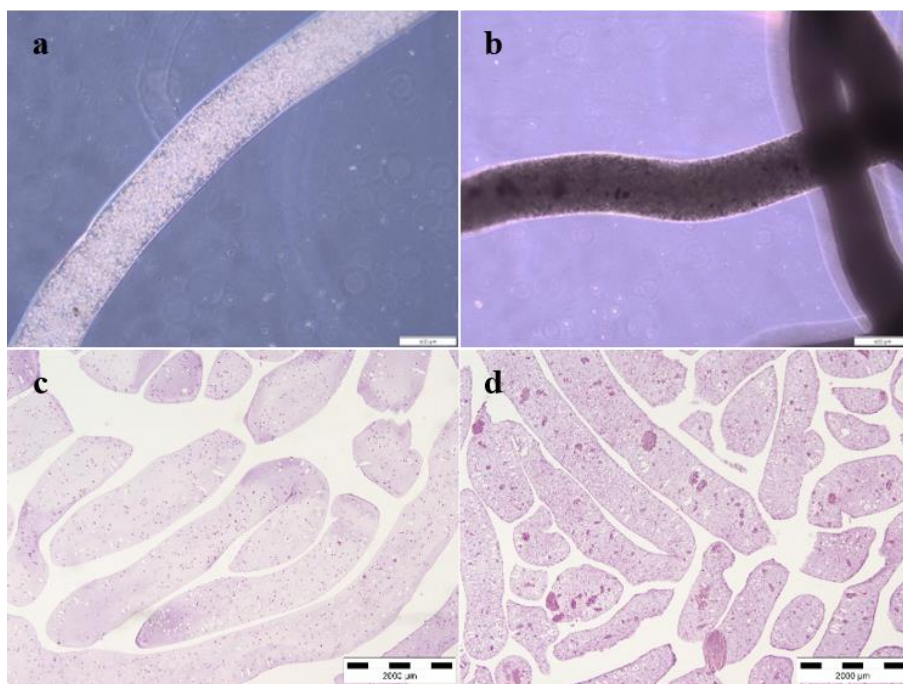


Slika 4.22. HOS sferoidi u Ca-alginatnim mikrovlaknima: a) 24 h nakon imobilizacije, b) 48 h nakon imobilizacije i c) 12 dana nakon imobilizacije. Optička mikrofotografija (a, razmernik = 200 µm) i fluorescentne mikrofotografije (b, c, *Live/Dead* esej: žive ćelije obojene su bojom CAM (zeleno), a mrtve bojom PI (crveno); razmernik = 200 µm)

Nakon imobilizacije sferoida moglo se uočiti da su ćelije ostale žive, a sferoidi ostali kompaktni (slika 4.22a, b). Ipak, primećeno je blago odstupanje od potpuno sferičnog obika (slika 4.22), što se može pripisati dejstvu smicajnih napona tokom istiskivanja. Treba napomenuti da se intenzivnije zeleno obojenje sferoida u medijumu u poređenju sa sferoidom u alginatu (slika 4.21b u poređenju sa 4.22b) može pripisati sporijoj difuziji boje kroz hidrogel u odnosu na medijum, čime je smanjena i dostupnost boje ćelijama u mikrovlaknima. Nakon 12 dana gajenja sferoida u Ca-alginatnim mikrovlaknima, ćelije u sferoidima ostale su žive (slika 4.22c), što je pokazalo da Ca-alginatna mikrovlakna omogućavaju održavanje dugotrajnih kultura sferoida. Dodatno, nisu uočene značajne razlike u veličini sferoida 2. i 12. dana. Uz to, nije primećeno formiranje nekrotične zone u centru sferoida. Treba napomenuti da detaljna analiza veličine sferoida nije rađena zbog nedovoljnog broja slika za adekvatnu statističku obradu.

4.3.5. Dugotrajne kulture K7M2-wt ćelijske linije u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima

Dva tipa mikrovlakana sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama, Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakna, dobijena su ručnim istiskivanjem 4×10^6 ćel cm^{-3} u: 1) 2 mas. % rastvoru Na-alginata, i 2) 2 mas. % rastvoru Na-alginata koji je sadržao 2 mas. % čestica HAP-a. K7M2-wt ćelije uspešno su imobilisane kao pojedinačne ćelije u Ca-alginatna mikrovlakna prečnika 500 ± 45 µm (slika 4.23a, c), kao i u HAP/Ca-alginatna mikrovlakna prečnika 600 ± 60 µm (slika 4.23b, d).

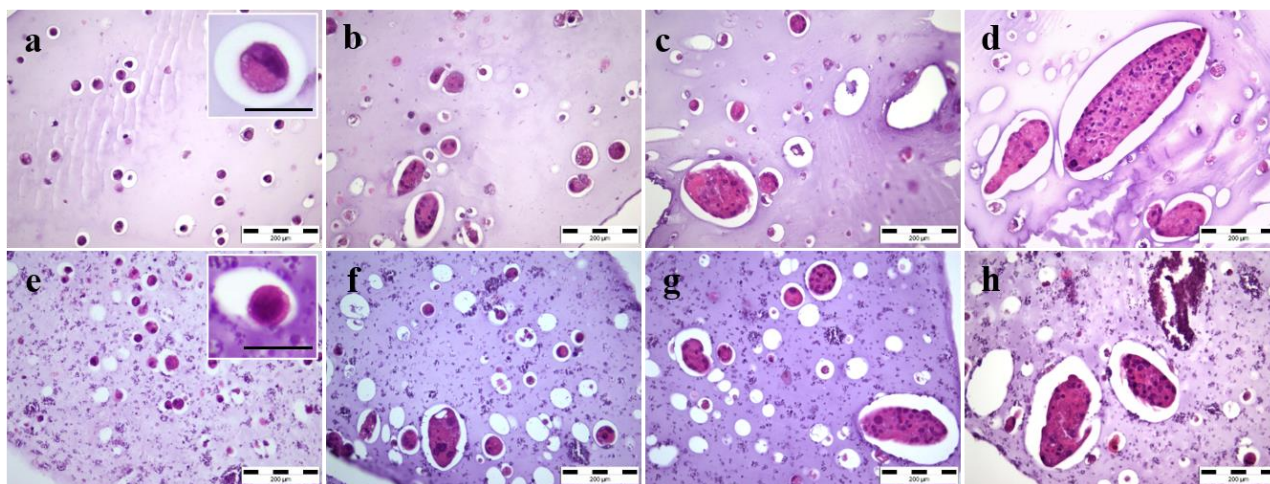


Slika 4.23. Ca-alginatna (levi panel – a, c) i HAP/Ca-alginatna (desni panel – b, d) mikrovlakna 24 h nakon imobilizacije K7M2-wt ćelija: optičke mikrofotografije (a, b, razmernik = 500 μm) i fotomikrografije histoloških preseka mikrovlakana (c, d, H&E bojenje, razmernik = 2 mm).

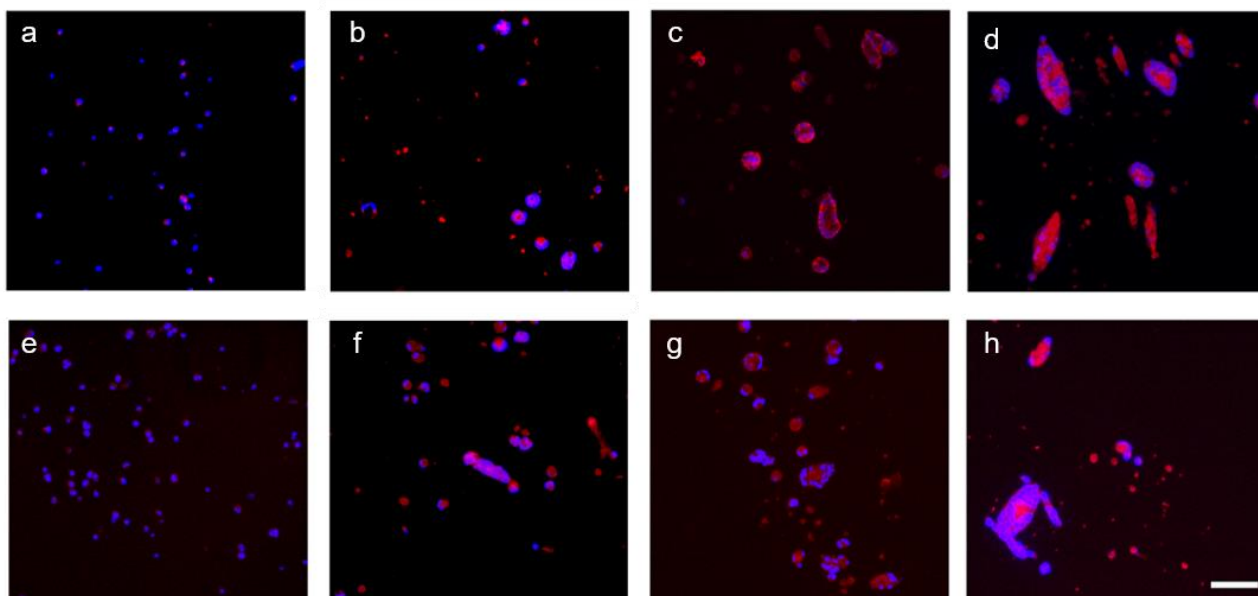
Nakon imobilizacije ćelije su ostale žive, što je pokazano histopatološkom analizom (slika 4.23c, d, slika 4.24a, e). Sa mikrofotografija histoloških preseka može se uočiti da su ćelije bile pleomorfne, odnosno da su pokazivale izraženu varijabilnost u veličini i obliku, sa velikim, hiperhromatičnim jedrima različitih veličina (slika 4.24a, b, insert), što je ukazalo da ćelije nakon imobilizacije zadržavaju morfološke karakteristike tipične za maligne ćelije.

Ćelije imobilisane u oba tipa mikrovlakana gajene su do 21 dana. Morfologija ćelija, proliferacija i metabolička aktivnost analizirane su primenom histopatološke analize i MTT testa.

Tokom celokupnog perioda gajenja u mikrovlaknima ćelije su ostale žive i zadržale su sposobnost proliferacije (slika 4.24). Takođe, ćelije su zadržale morfologiju karakterističnu za maligne ćelije, kao što su velika, tamna, hiperhromatična jedra različitih veličina, okružena citoplazmom u različitim količinama (slika 4.24). Treba istaći da su pojedinačne ćelije spontano formirale sferične i izdužene agregate (slike 4.24 i 4.25).

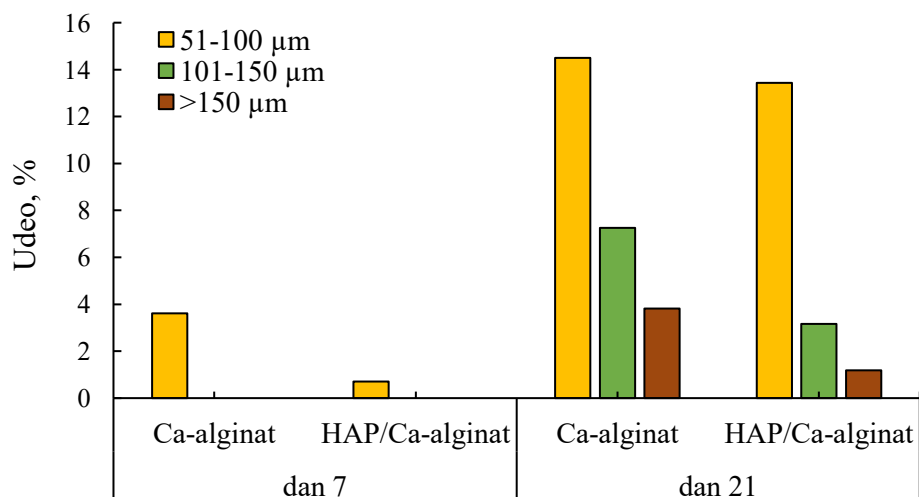


Slika 4.24. Mikrofotografije histoloških preseka Ca-alginatnih (gornji panel) i HAP/Ca-alginatnih (donji panel) mikrovlakana sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama: (a, e) 1. dana, (b, f) 7. dana, (c, g) 14. dana i (d, h) 21. dana (H&E bojenje, razmernik = 200 μm).



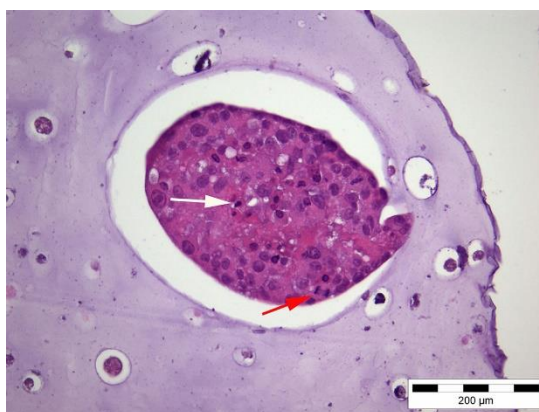
Slika 4.25. Mikrofotografije histoloških preseka imobilisanih K7M2-wt ćelija u Ca-alginatnim (gornji panel) i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima (donji panel): (a, e) 1. dana, (b, f) 7. dana, (c, g) 14. dana i (d, h) 21. dana, imunofluorescentno obojenih primenom anti-tubulin antitela. Tubulin je obojen crveno, a jedra plavo (razmernik = 100 μm).

Prvi agregati (prečnika 15 - 100 μm) uočeni su 7. dana gajenja (slika 4.24b, f). Najzastupljenija veličina agregata 7. dana bila je u opsegu prečnika 15 - 50 μm kod oba tipa mikrovlakana, a srednji prečnik agregata je iznosio $28 \pm 9 \mu\text{m}$ za Ca-alginatna, i $22 \pm 8 \mu\text{m}$ za HAP/Ca-alginatna mikrovlakna (slika 4.26).



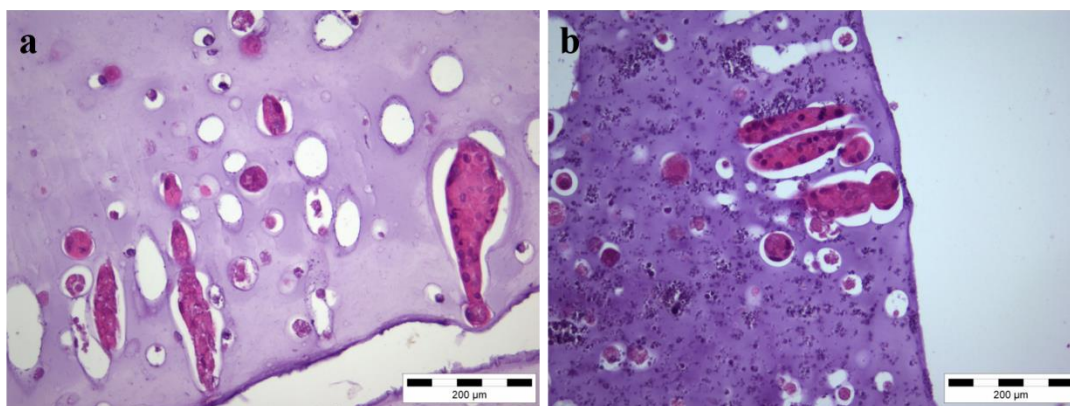
Slika 4.26. Udeli agregata K7M2-wt ćelija većih od 50 µm u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima. Ostatak do 100 % predstavljaju agregati veličine 15 – 50 µm. Veličina agregata definisana je preko ekvivalentnog prečnika izračunatog korišćenjem jednačine 3.1. Izmereno je najmanje po 190 agregata u svakoj grupi.

Tokom poslednje 2 nedelje gajenja, agregati su postali kompaktniji, sa glatkim spoljašnjim konturama (slika 4.24c, d, g, h), i veći, čime se povećao udeo agregata većih od 50 µm, koji je bio blago, ali ne i statistički značajno veći u Ca-alginatnim mikrovlaknima u poređenju sa HAP/Ca-alginatnim (slika 4.26). Najveći agregati uočeni su 21. dana gajenja i dostigli su veličinu od oko 210 µm u oba tipa mikrovlakana. Na periferiji većih agregata primećene su mitotske figure (ćelije sa jasno vidljivim hromozomima u različitim fazama mitoze), što je ukazalo na deobu ćelija, dok su u centralnom delu agregata primećene pojedinačne ćelije u kariopiknozi (sažimanje hromatina, jedro se smanjuje i postaje tamno) i karioreksi (raspadanje jedra na fragmente), što je karakteristično za apoptozu (slika 4.27).



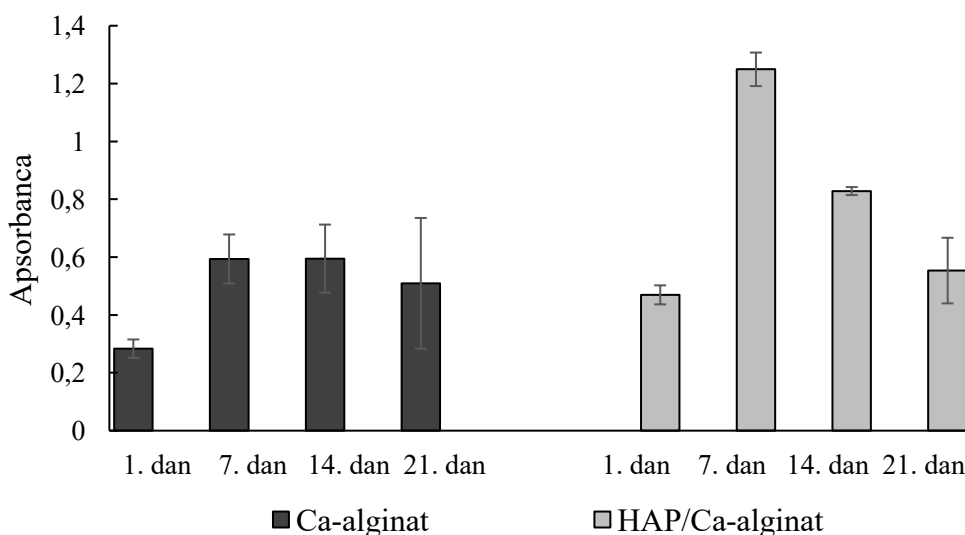
Slika 4.27. Reprezentativna mikrofotografija histološkog preseka agregata K7M2-wt ćelija u Ca-alginatnom mikrovlaknu 21. dana gajenja na kojoj se može uočiti ćelija u mitozu (crvena strelica) i ćelija u kariopiknozi (beli strelica) (H&E bojenje, razmernik = 200 µm).

Specifična morfologija izduženih ćelijskih agregata, koja se sastoji od šireg dela („glave“) usmerene ka spoljašnjoj ivici mikrovlakana, i užeg dela („repa“) usmerenog ka osi mikrovlakana, jasno je uočena 14. dana gajenja (slika 4.28). Ovakav tip agregata bio je prisutan u mikrovlaknima tokom celokupnog vremena gajenja.



Slika 4.28. Reprezentativne mikrofotografije izduženih agregata K7M2-wt ćelija na histološkim presecima a) Ca-alginatnih i b) HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana 14. dana gajenja (H&E bojenje, razmernik = 200 µm).

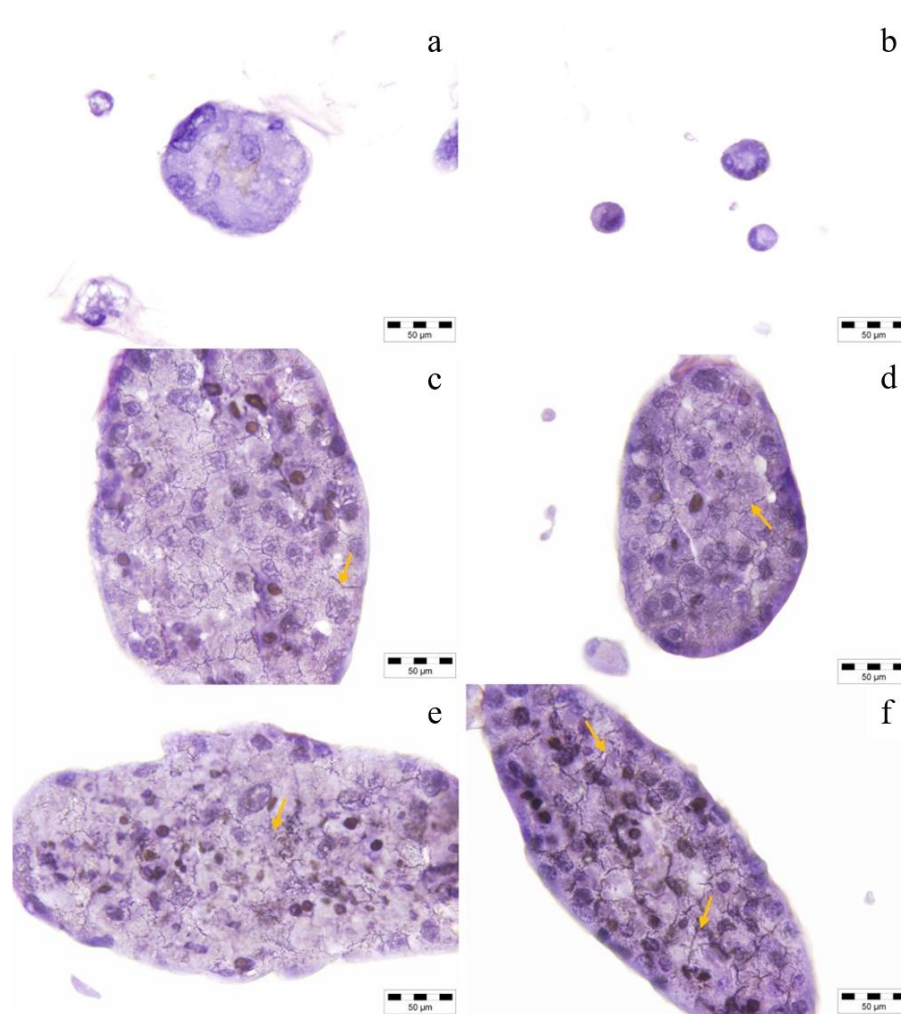
Rezultati histološke analize podržani su i rezultatima dobijenim MTT testom. Pokazano je da je metabolička aktivnost ćelija imobilisanih u oba tipa mikrovlakana porasla nakon 7 dana gajenja (~2,1 i ~2,7 puta u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima, redom) u odnosu na metaboličku aktivnost ćelija prvog dana (slika 4.29). Nakon toga, metabolička aktivnost ćelija u oba tipa mikrovlakana je polako opadala, dostižući 21. dana približne vrednosti kao 1. dana (slika 4.29). Smanjenje metaboličke aktivnosti može se pripisati formiranju ćelijskih agregata, što je dovelo do apoptoze u centralnom delu agregata, najverovatnije usled ograničenog prenosa kiseonika i nutrijenata do ćelija u središnjem delu. Ova pojava je potvrđena histološkom analizom (slika 4.27) i bila je izraženija u HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima, gde je veći prečnik mikrovlakana dodatno usporio prenos mase. Treba napomenuti da je naizgled veća metabolička aktivnost u HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima prvog dana u odnosu na Ca-alginatna mikrovlakna (slika 4.29) posledica većeg prečnika ovih mikrovlakana, što je dovelo do veće zapremine uzorka u ovoj grupi, s obzirom da su uzorci mikrovlakana bili iste dužine (tj. 3 × 3 cm, poglavlje 3.8.6.).



Slika 4.29. Metabolička aktivnost K7M2-wt ćelija imobilisanih u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima tokom vremena izražena kao apsorbanca MTT rastvora na 570 nm. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost 4 merenja).

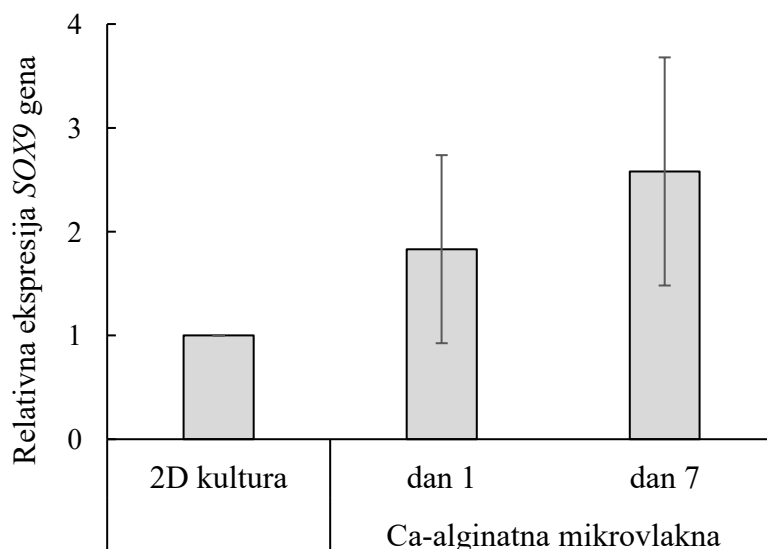
Dodatno, agregati su analizirani kako bi se utvrdilo prisustvo vanćelijskog matriksa. U oba tipa mikrovlakana, ćelije u agregatima su počele da proizvode retikulinska vlakna, što je pokazano retikulinskim bojenjem histoloških preseka (slika 4.30). Ova vlakna su 21. dana izgledala kao fine,

crne niti koje su formirale jasno definisanu mrežu, i ona je bila blago izraženija u HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima (slika 4.30e, f).



Slika 4.30. Mikrofotografije histoloških preseka Ca-alginatnih (levi panel) i HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana (desni panel) sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama (a, b) 7. dana, (c, d) 14. dana i (e, f) 21. dana. Žute strelice pokazuju retikulinska vlakna (retikulinsko bojenje, razmernik = 50 μm).

Kako bi se ispitala mogućnost analize ekspresije gena u 3D kulturama, *SOX9* gen, transkripcioni faktor koji učestvuje u progresiji tumora, izabran je kao model gen. Njegova ekspresija u ćelijama gajenim u Ca-alginatnim mikrovlaknima analizirana je 1. i 7. dana gajenja, dok su ćelije gajene u 2D kulturi služile kao kontrola (slika 4.31).



Slika 4.31. Ekspresija *SOX9* gena u K7M2-wt ćelijama gajenim u 2D kulturi i u Ca-alginatnim mikrovlaknima, analizirana 1. i 7. dana gajenja. Relativni nivoi ekspresije *SOX9* prikazani su kao promene u ekspresiji gena, normalizovane u odnosu na *GABDH* i izražene relativno u odnosu na vrednost u ćelijama gajenim u 2D kulturi, koja je postavljena na 1. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija ($n=3$).

Na slici 4.31 prikazana je relativna ekspresija *SOX9* gena ćelija gajenih u Ca-alginatnim mikrovlaknima 1. i 7. dana gajenja, kao i ćelija gajenih u 2D kulturi. U poređenju sa 2D kulturom, može se uočiti porast ekspresije *SOX9* gena u ćelijama gajenim u Ca-alginatnim mikrovlaknima od ~1,8 i ~2,6 puta 1. i 7. dana gajenja, redom. Iako ovo povećanje u ekspresiji nije bilo statistički značajno, vrednosti jasno ukazuju na trend povećane ekspresije u 3D kulturama.

Treba napomenuti da ekspresija *SOX9* gena u ćelijama iz HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana nije analizirana zbog nemogućnosti izolovanja RNK iz ovih ćelija u dovoljnoj količini i zadovoljavajućeg kvaliteta za dalje analize.

Na kraju, može se zaključiti da Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakna podržavaju dugotrajne kulture K7M2-wt ćelija, pri čemu doprinose očuvanju morfologije ćelija, podstiču proliferaciju, metaboličku aktivnost, formiranje agregata i sintezu ekstracelularnog matriksa.

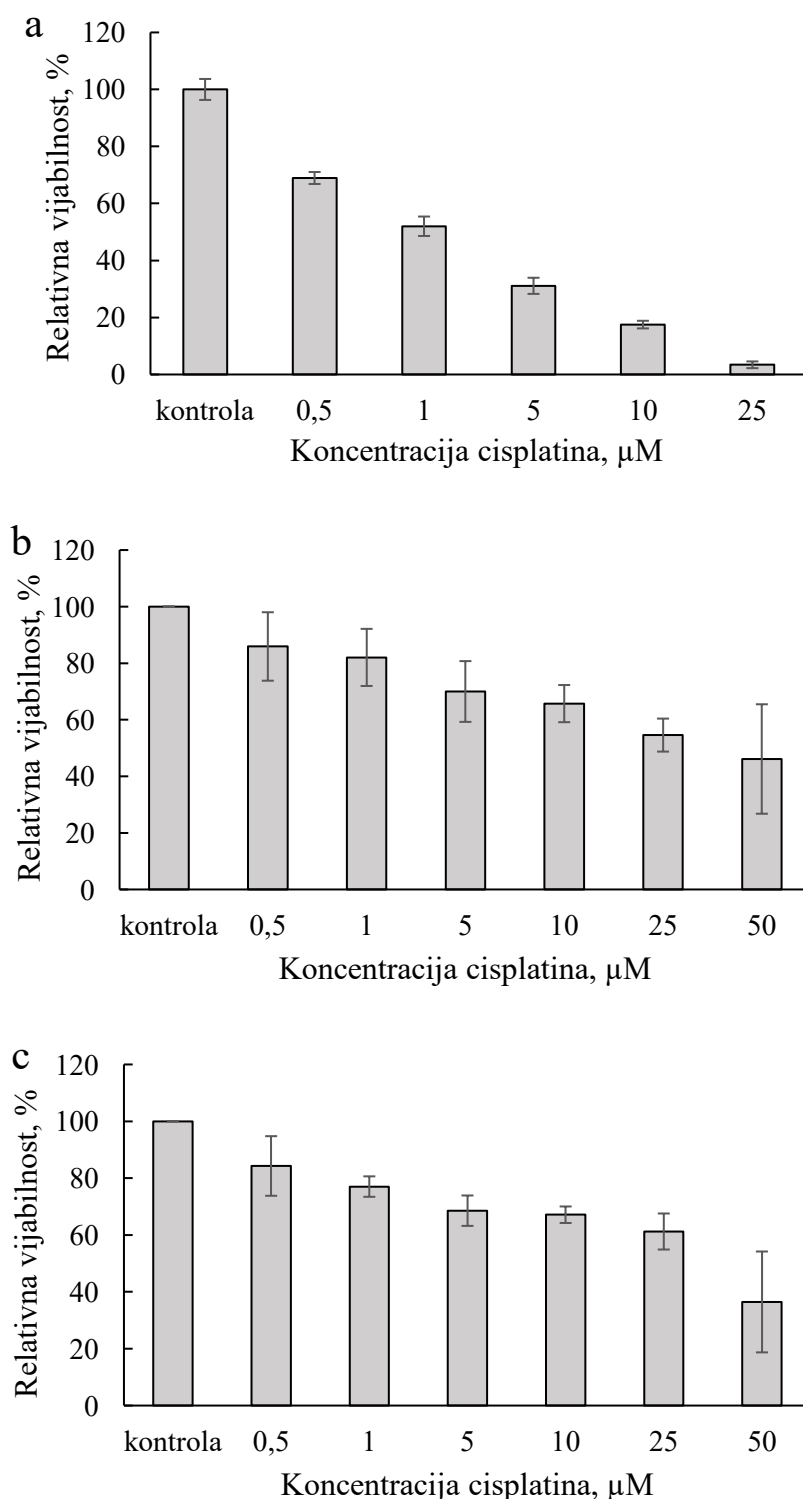
4.4. Ispitivanje efekta antitumorskih lekova na 2D i 3D ćelijske kulture

U trećem koraku istraživanja ispitana je mogućnost primene razvijenog 3D modela za ispitivanje osetljivosti ćelija na antitumorske lekove. U tu svrhu, ćelije gajene u alginatnim mikrovlaknima tretirane su odgovarajućim antitumorskim lekom: NCI-H460 ćelije imobilisane u Ba-alginatnim mikrovlaknima tretirane su cisplatinom, etopozidom i vinorelbinom, dok su K7M2-wt ćelije imobilisane u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima tretirane doksorubicinom. Uporedo, NCI-H460 i K7M2-wt ćelije gajene u 2D kulturama takođe su tretirane odgovarajućim lekovima kako bi se mogla uporediti osetljivost na ove lekove između ćelija gajenih u 3D i 2D kulturama.

4.4.1. Tretman 2D i 3D kultura NCI-H460 ćelija u Ba-alginatnim mikrovlaknima cisplatinom

NCI-H460 ćelije imobilisane u Ba-alginatnim mikrovlaknima tretirane su različitim koncentracijama cisplatina u 2 eksperimentalne serije: 1) 24 h nakon imobilizacije i 2) 96 h nakon imobilizacije, dok su ćelije gajene u 2D kulturi tretirane 24 h nakon sejanja. Tretman je trajao 72 h, a kontrolu su činile

netretirane ćelije gajene pod istim uslovima i u istom trajanju kao odgovarajuće tretirane grupe. Vijabilnost ćelija analizirana je primenom MTT testa (slika 4.32).

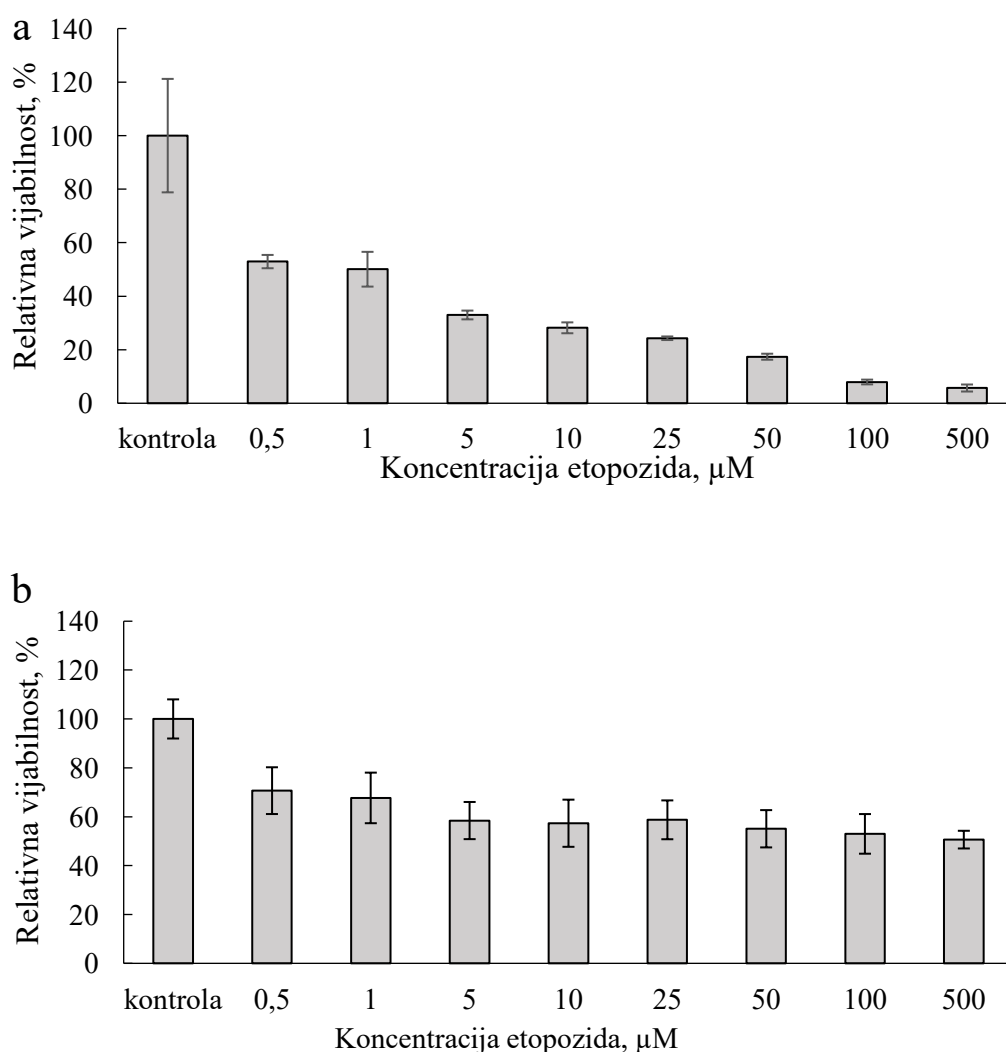


Slika 4.32. Relativna vijabilnost ćelija tretiranih cisplatinom u: a) 2D kulturi, b) Ba-alginatnim mikrovlaknima 24 h nakon imobilizacije i c) Ba-alginatnim mikrovlaknima 96 h nakon imobilizacije, određena nakon završetka tretmana koji je trajao 72 h. Vijabilnost ćelija izražena je kao procenat u odnosu na vijabilnost netretiranih ćelija u istom vremenskom trenutku unutar svake grupe, koja je postavljena na 100 %. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja).

Eksperimentalni rezultati su pokazali da ćelije gajene u mikrovlaknima imaju značajno veću rezistenciju na tretman cisplatinom u poređenju sa ćelijama gajenim u 2D kulturi (slika 4.32). Procenjene IC_{50} vrednosti u 3D kulturama bile su između 25 i 50 μM za tretman i nakon 24 h i nakon 96 h, dok je u 2D kulturi vrednost IC_{50} iznosila $\sim 1 \mu M$. Ovaj rezultat ukazuje da su ćelije u 3D kulturi bile 25–50 puta rezistentnije na cisplatin u odnosu na ćelije gajene u 2D kulturi.

4.4.2. Tretman 2D i 3D kultura NCI-H460 ćelija u Ba-alginatnim mikrovlaknima etopozidom

NCI-H460 ćelije imobilisane u Ba-alginatnim mikrovlaknima tretirane su različitim koncentracijama etopozida 96 h nakon imobilizacije, dok su ćelije gajene u 2D kulturi tretirane 24 h nakon sejanja. Tretman je trajao 72 h, a kontrolu su činile netretirane ćelije gajene pod istim uslovima i u istom trajanju kao odgovarajuće tretirane grupe. Vijabilnost ćelija analizirana je primenom MTT testa (slika 4.33).



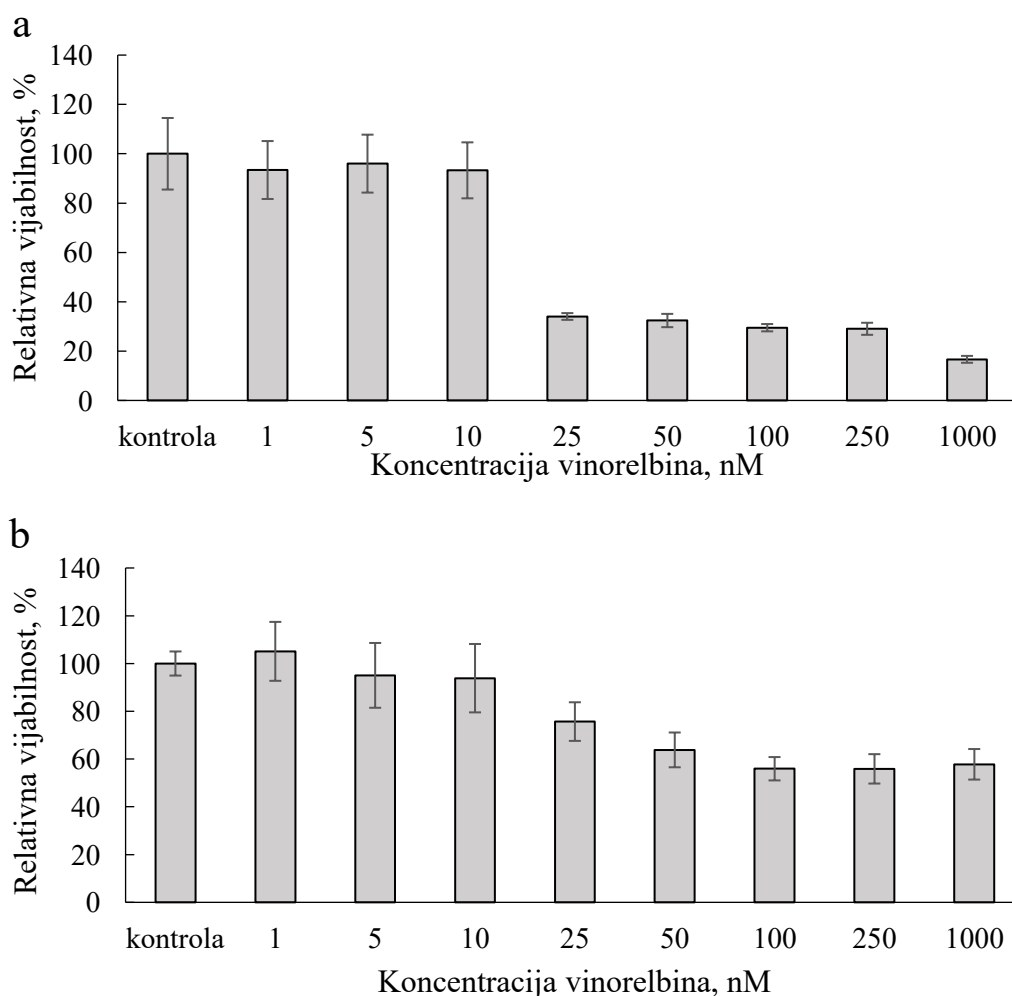
Slika 4.33. Relativna vijabilnost ćelija tretiranih etopozidom u: a) 2D kulturi i b) Ba-alginatnim mikrovlaknima 96 h nakon imobilizacije. Vijabilnost ćelija izražena je kao procenat u odnosu na vijabilnost netretiranih ćelija u istom vremenskom trenutku unutar svake grupe, koja je postavljena na 100 %. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja).

Ćelije gajene u mikrovlaknima pokazale su značajno veću rezistenciju na tretman etopozidom u poređenju sa ćelijama gajenim u 2D kulturi. U 2D kulturi jasno je uočen odgovor ćelija zavisao od doze leka (slika 4.33a), sa procenjenom vrednošću IC_{50} u opsegu 0,5–1 μM , gde je najveća

primenjena doza etopozida od 500 μM dovela do smanjenja relativne vijabilnosti ćelija na 6 %. Nasuprot tome, u 3D kulturi tretman sa 5 μM smanjio je relativnu vijabilnost na 58 ± 8 %, dok dalji porast koncentracije etopozida do 500 μM nije izazvao statistički značajnu promenu, već je uočen plato relativne vijabilnosti ćelija u ovom opsegu koncentracija (slika 4.33b).

4.4.3. Tretman 2D i 3D kultura NCI-H460 ćelija u Ba-alginatnim mikrovlaknima vinorelbinom

NCI-H460 ćelije imobilisane u Ba-alginatnim mikrovlaknima tretirane su i različitim koncentracijama vinorelbina 96 h nakon imobilizacije, dok su ćelije gajene u 2D kulturi tretirane 24 h nakon sejanja. Tretman je trajao 72 h, a kontrolu su činile netretirane ćelije gajene pod istim uslovima i u istom trajanju kao odgovarajuće tretirane grupe. Vijabilnost ćelija analizirana je primenom MTT testa (slika 4.34).

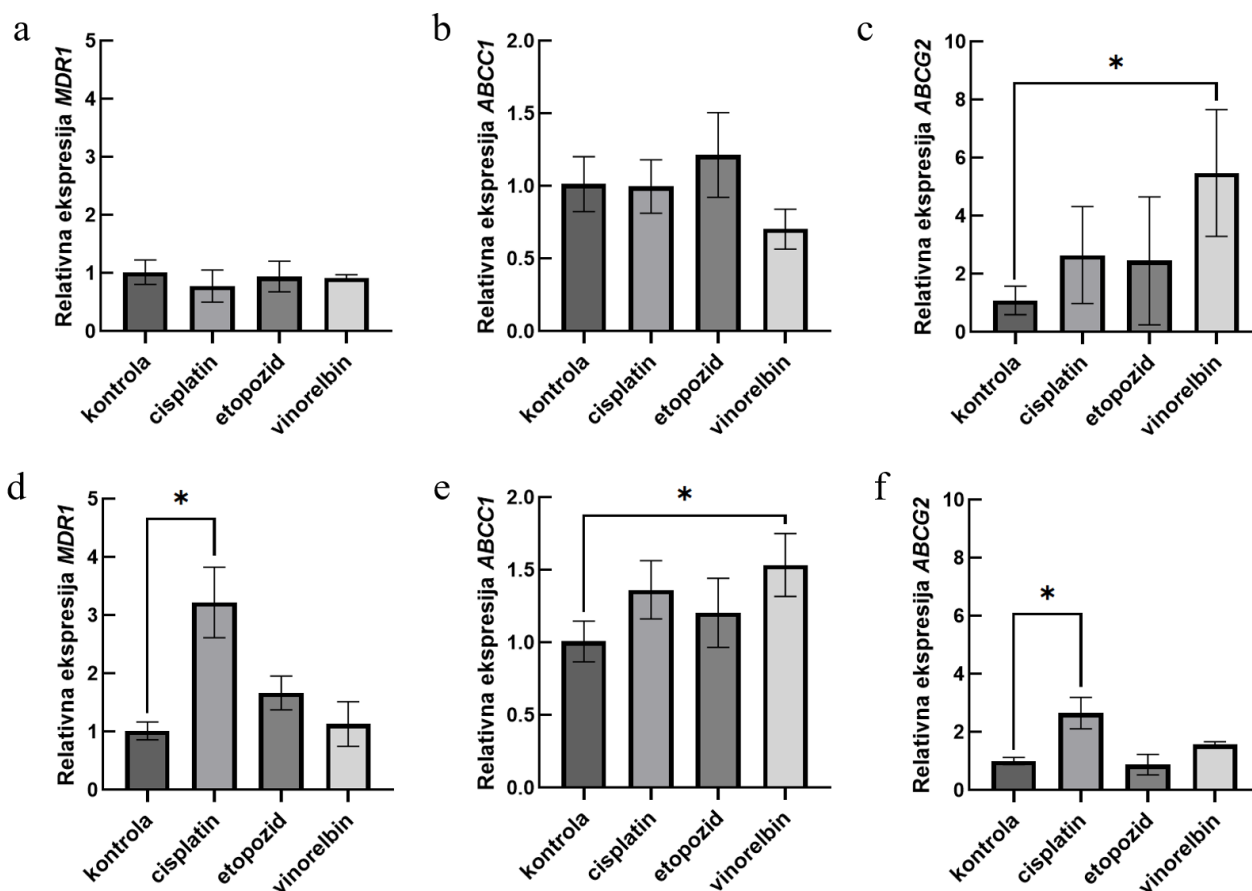


Slika 4.34. Relativna vijabilnost ćelija tretiranih vinorelbinom u a) 2D kulturi i b) Ba-alginatnim mikrovlaknima 96 h nakon imobilizacije. Vijabilnost ćelija izražena je kao procenat u odnosu na vijabilnost netretiranih ćelija u istom vremenskom trenutku unutar svake grupe, koja je postavljena na 100 %. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja).

Ćelije gajene u mikrovlaknima pokazale su i ovde značajno veću rezistenciju na tretman vinorelbinom u poređenju sa ćelijama gajenim u 2D kulturi. U 2D kulturi procenjena vrednost IC_{50} bila je između 10 i 25 nM vinorelbina (slika 4.34a), dok u 3D kulturi IC_{50} vrednost nije dostignuta u celom ispitivanom opsegu koncentracija (1–1000 nM) (slika 4.34b).

4.4.4. Ekspresija gena *MDR1*, *ABCC1* i *ABCG2* u NCI-H460 ćelijama gajenim u 2D i 3D kulturama nakon tretmana antitumorskim lekovima

Uticaj tretmana antitumorskim lekovima na ekspresiju gena povezanih sa multirezistencijom na lekove (*MDR1*, *ABCC1* i *ABCG2*) ispitano je u 2D i 3D kulturama NCI-H460 ćelija. Na osnovu rezultata MTT testa, određene su IC_{30} vrednosti za svaki od ispitivanih lekova. U 2D kulturama one su iznosile 0,5 μ M za cisplatin, 0,4 μ M za etopozid i 17 nM za vinorelbin, dok su u 3D kulturama iznosile 5 μ M za cisplatin, 1 μ M za etopozid i 40 nM za vinorelbin. Ove koncentracije korišćene su za tretman ćelija, koji je sproveden 24 h nakon sejanja u 2D kulturama, odnosno 96 h nakon imobilizacije u 3D kulturama. Nakon 24-časovnog tretmana, ekspresija gena *MDR1*, *ABCC1* i *ABCG2* analizirana je RT-qPCR metodom (slika 4.35).



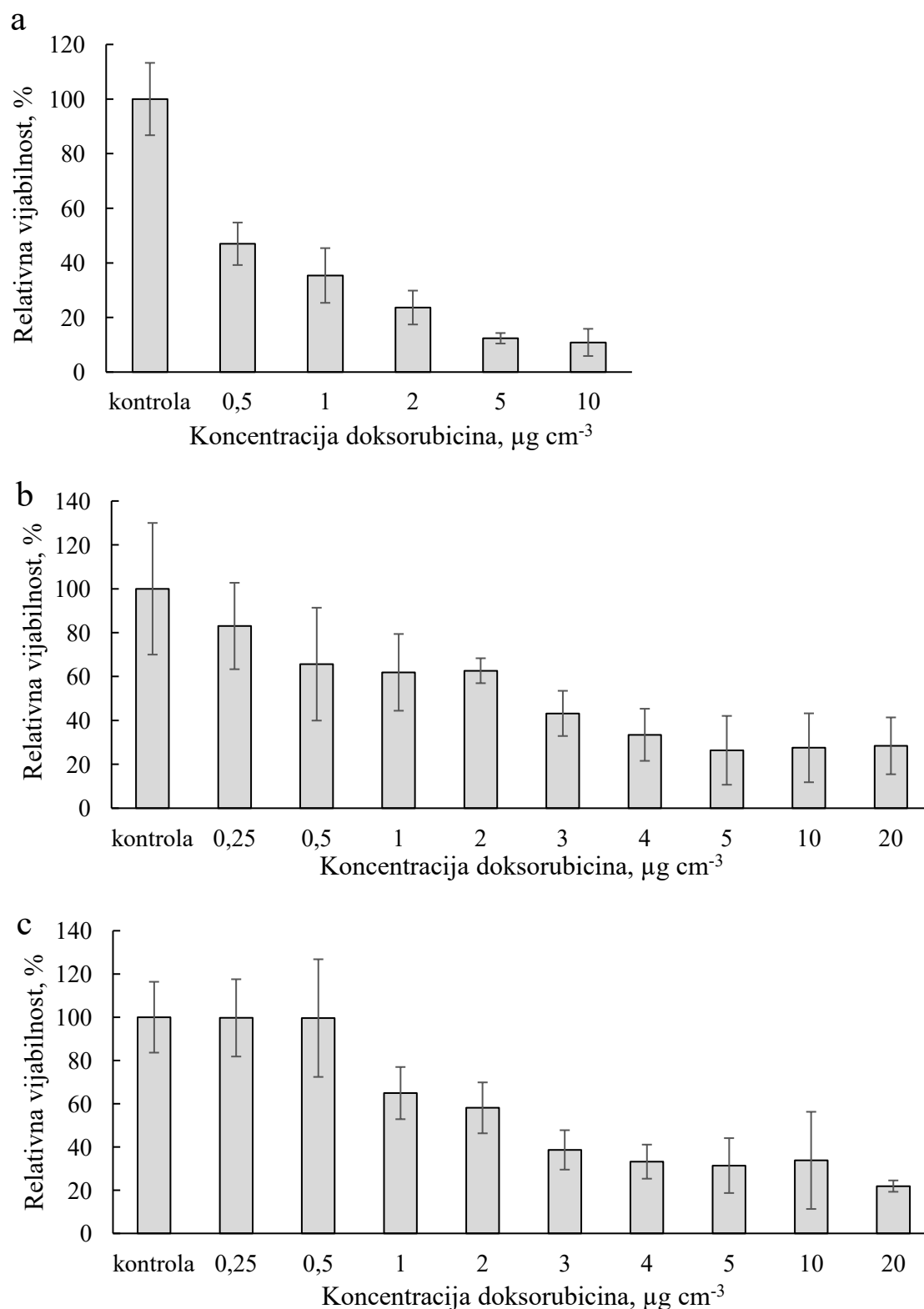
Slika 4.35. Relativna ekspresija gena (a, d) *MDR1*, (b, e) *ABCC1* i (c, f) *ABCG2* u 2D kulturama (a, b, c) i 3D kulturama (d, e, f) NCI-H460 ćelija 24 h nakon tretmana odgovarajućim koncentracijama cisplatina, etopozida i vinorelbina (IC_{30}). Ćelije u 2D kulturama tretirane su 24 h nakon sejanja, a u 3D kulturama 96 h nakon imobilizacije. Relativni nivoi ekspresije *MDR1*, *ABCC1* i *ABCG2* gena prikazani su kao promene u ekspresiji gena, normalizovane u odnosu na *ACTB* i izražene relativno u odnosu na kontrolu, koja je postavljena na 1. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja); * označava statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$)

Rezultati su pokazali da NCI-H460 ćelije gajene u 3D kulturi imaju 3,2 puta statistički značajno veću ekspresiju *MDR1* gena i 2,7 puta statistički značajno veću ekspresiju *ABCG2* gena nakon tretmana cisplatinom u odnosu na netretirane ćelije (slika 4.35d, f), dok promene u nivou ekspresije *MDR1* i *ABCG2* gena ćelija u 2D kulturi tretiranih cisplatinom nisu bile značajne (slika 4.35a, c). Sa druge

strane, tretman vinorelbinom doveo je do 1,5 puta statistički značajno veće ekspresije *ABCC1* gena u ćelijama gajenim u 3D kulturi u odnosu na netretirane ćelije (slika 4.35e), dok promene u nivou ekspresije *ABCC1* gena ćelija u 2D kulturi tretiranih vinorelbinom nisu bile značajne (slika 4.35b). U 2D kulturama, pokazano je da je ekspresija sva 3 gena nakon tretmana antitumorskim lekovima ostala nepromenjena, izuzev u slučaju tretmana vinorelbinom koji je doveo do 5,5 puta statistički značajno veće ekspresije u poređenju sa netretiranim ćelijama (slika 4.35c).

4.4.5. Tretman 2D i 3D kultura K7M2-wt ćelija u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima doksorubicinom

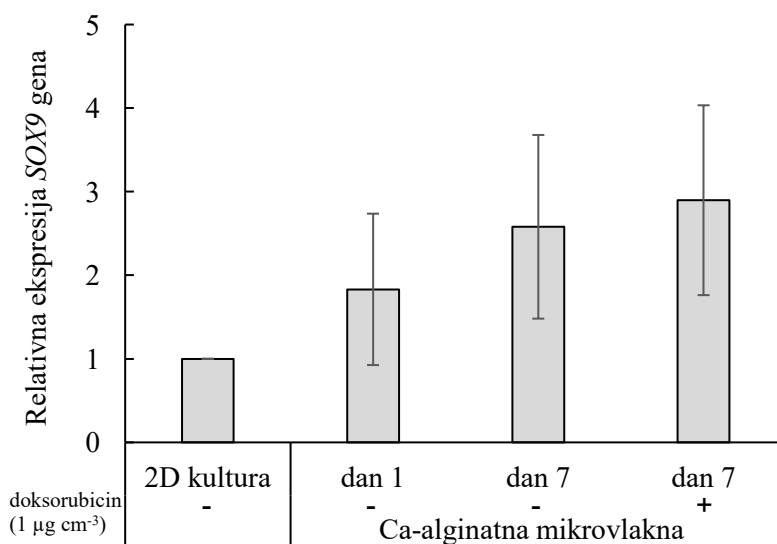
K7M2-wt ćelije imobilisane u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima tretirane su različitim koncentracijama doksorubicina 24 h nakon imobilizacije, dok su ćelije gajene u 2D kulturi tretirane 24 h nakon sejanja. Tretman je trajao 24 h, nakon čega je vijabilnost ćelija analizirana primenom MTT testa (slika 4.36).



Slika 4.36. Relativna vijabilnost ćelija tretiranih doksorubicinom u: a) 2D kulturi, b) Ca-alginatnim mikrovlaknima i c) HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima 24 h nakon imobilizacije, određena nakon 24-časovnog tretmana. Vijabilnost ćelija izražena je kao procenat u odnosu na vijabilnost netretiranih ćelija u svakoj grupi, koja je postavljena na 100 %. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 merenja).

Ćelije gajene u 2D kulturi bile su relativno osetljive na doksorubicin, sa vrednošću IC_{50} od $\sim 0,5 \mu\text{g cm}^{-3}$ (slika 4.36a). Sa druge strane, ćelije gajene u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim

mikrovlaknima pokazale su veću rezistenciju na tretman doksorubicinom u poređenju sa ćelijama gajenim u 2D kulturi, pri čemu su procenjene IC_{50} vrednosti bile između 2 i 3 $\mu\text{g cm}^{-3}$ (slika 4.36b, c). Dodatno, analizirana je ekspresija gena u 3D kulturama koje su nakon 24-časovnog tretmana sa 1 $\mu\text{g cm}^{-3}$ doksorubicinom gajene još 5 dana (7. dan). Netretirane ćelije imobilisane u mikrovlaknima gajene 1 dan i 7 dana služile su kao 3D kontrola, dok su ćelije zasejane u monosloju služile kao 2D kontrola. Ekspresija *SOX9* gena u tretiranim 3D kulturama povećala se ~2,9 puta nakon 7 dana u poređenju sa 2D kulturom (slika 4.37). Treba napomenuti da ovo povećanje ipak nije bilo statistički značajno.



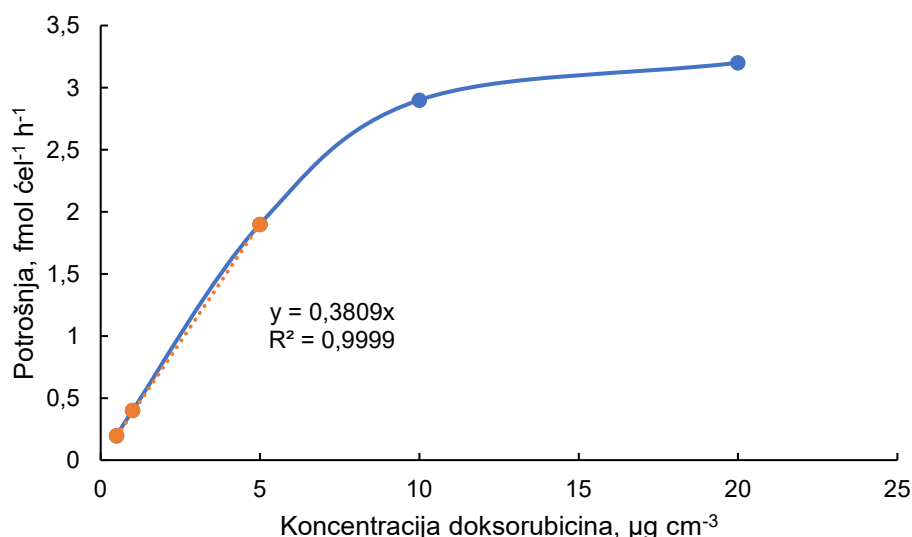
Slika 4.37. Ekspresija *SOX9* gena u ćelijama gajenih u 2D kulturi, analiziranih nakon 24 h, i u Ca-alginatnim mikrovlaknima sa (+) ili bez (-) tretmana sa 1 $\mu\text{g cm}^{-3}$ doksorubicina 24 h nakon imobilizacije, analizirana 1 i 7 dana nakon imobilizacije (5 dana po završetku tretmana za tretiranu grupu). Relativni nivoi ekspresije *SOX9* prikazani su kao promene u ekspresiji gena, normalizovane u odnosu na *GABDH* i izražene relativno u odnosu na vrednost u ćelijama gajenim u 2D kulturi, koja je postavljena na 1. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija (eksperimentalni podaci predstavljaju srednju vrednost 3 merenja).

4.4.6. Matematičko modelovanje prenosa doksorubicina

Kako bi se ispitalo da li je prenos lekova u alginatnim mikrovlaknima efikasan, odnosno potvrdilo da uočena veća rezistencija ćelija gajenih u 3D kulturama nije posledica ograničene difuzije lekova kroz mikrovlakna, primenjeno je matematičko modelovanje prenosa mase kroz jedno mikrovlakno u statičnim uslovima. Svi korišćeni lekovi pripadaju grupi malih molekula (molekulska masa $< 1000 \text{ g mol}^{-1}$), odnosno molekulska masa doksorubicina iznosi 543,52 g mol^{-1} , cisplatina 300,01 g mol^{-1} , etopozida 588,56 g mol^{-1} i vinorelbina 778,93 g mol^{-1} . Pretpostavljeno je da je njihov prenos kroz mikrovlakna približno isti, a kao reprezentativan primer odabrano je modelovanje prenosa doksorubicina u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima.

Za poluprečnik mikrovlakana usvojena je vrednost od 250 μm za Ca-alginatna, odnosno 300 μm za HAP/Ca-alginatna, na osnovu srednjih vrednosti izmerenih prečnika. Za koncentraciju ćelija u mikrovlaknima usvojena je vrednost od $4 \times 10^6 \text{ cel cm}^{-3}$, na osnovu početne koncentracije ćelija. Za koeficijent difuzije doksorubicina usvojena je vrednost koeficijenta difuzije doksorubicina u 1 mas. % agaroznom gelu od $3,62 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Degerstedt i sar., 2022).

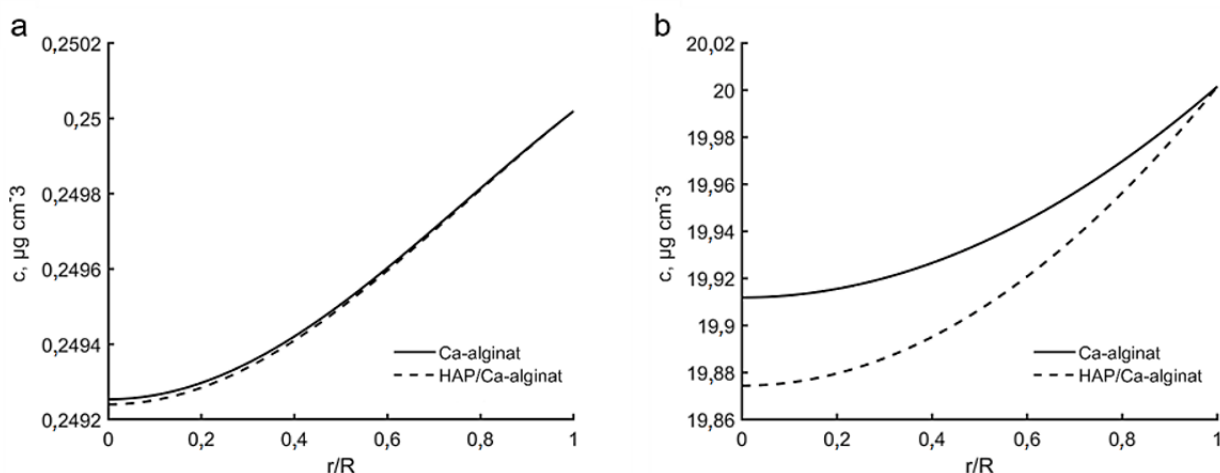
Kako bi se odredila kinetika potrošnje doksorubicina, analizirani su literaturni podaci o potrošnji doksorubicina od strane ćelija mišjeg melanoma nakon tročasovne izloženosti leku (Eliaz i sar., 2004). Na slici 4.38 prikazana je potrošnja doksorubicina u funkciji početne koncentracije.



Slika 4.38. Zavisnost potrošnje doksorubicina od početne koncentracije doksorubicina, određena na osnovu literaturnih podataka (*Eliaz i sar., 2004*), pri čemu je potrošnja izražena kao količina doksorubicina akumulirana po ćeliji nakon 3 h inkubacije sa lekom.

Na slici 4.38 se uočava linearna zavisnost pri nižim koncentracijama (do $\sim 5 \mu\text{g cm}^{-3}$), koja odgovara kinetici prvog reda i može se opisati jednačinom $q = k_1 c$, gde je q potrošnja doksorubicina po ćeliji ($\text{fmol ćel}^{-1} \text{h}^{-1}$), c koncentracija doksorubicina u medijumu ($\mu\text{g cm}^{-3}$), a k_1 konstanta brzine prvog reda. U skladu sa tim, vrednost konstante k_1 određena je kao nagib linearnog dela zavisnosti $q-c$. Dobijena vrednost k_1 zatim je pomnožena sa gustinom ćelija ($4 \times 10^6 \text{ ćel cm}^{-3}$), a dobijena vrednost od $2,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ korišćena je za modelovanje pri tretmanu najnižom koncentracijom doksorubicina ($0,25 \mu\text{g cm}^{-3}$). Pri većim početnim koncentracijama doksorubicina uočen je plato, što odgovara kinetici nultog reda. Konstanta brzine nultog reda, k_0 , određena je množenjem potrošnje pri najvišoj primenjenoj koncentraciji doksorubicina ($20 \mu\text{g cm}^{-3}$) sa gustinom ćelija ($4 \times 10^6 \text{ ćel cm}^{-3}$), čime je dobijena vrednost od $3,6 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-3} \text{s}^{-1}$, koja je korišćena za modelovanje pri tretmanu najvećom koncentracijom doksorubicina ($20 \mu\text{g cm}^{-3}$).

Postavljeni su početni i granični uslovi kao u slučaju modelovanja transferina (jednačine 4.13–4.15). Parcijalna diferencijalna jednačina 4.11 rešena je numerički, primenom funkcije *pdepe* u programu *MATLAB R2018a* (*MathWorks Inc., SAD*). Primenjen je nepromenljiv broj tačaka za radijalnu koordinatu r , pri čemu je radijalna mreža bila definisana sa 100 tačaka. Korak u vremenu (Δt) paket *MATLAB* automatski varira u cilju optimizacije tačnosti i stabilnosti rešenja. Na slici 4.39 prikazani su profili koncentracije doksorubicina u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima nakon tretmana sa $0,25 \mu\text{g cm}^{-3}$ (slika 4.39a) i $20 \mu\text{g cm}^{-3}$ (slika 4.39b) i nakon dostizanja stacionarnog stanja. Koncentracija je prikazana kao funkcija normalizovanog radijalnog rastojanja u odnosu na poluprečnik mikrovlakana.



Slika 4.39. Profili koncentracija doksorubicina (c) u Ca-alginatnom i HAP/Ca-alginatnom mikrovlaknu sa imobilisanim K7M2-wt ćelijama kao funkcija normalizovanog radijalnog rastojanja u mikrovlaknu (r/R) nakon postizanja stacionarnog stanja posle tretmana doksorubicinom u koncentraciji: a) $0,25 \mu\text{g cm}^{-3}$ (reakcija prvog reda) i b) $20 \mu\text{g cm}^{-3}$ (reakcija drugog reda) ($r/R = 0$ označava osu mikrovlakna, dok $r/R = 1$ označava spoljašnju površinu mikrovlakna).

Kod oba tipa mikrovlakana koncentracioni profili su gotovo uniformni, pri čemu koncentracija doksorubicina u osi mikrovlakana dostiže 99,7 % koncentracije u medijumu pri tretmanu sa $0,25 \mu\text{g cm}^{-3}$ u oba tipa mikrovlakana (slika 4.39a), dok pri tretmanu sa $20 \mu\text{g cm}^{-3}$ koncentracija u osi Ca-alginatnih i HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana dostiže 97,4 % i 96,4 %, redom (slika 4.39b). Treba napomenuti da male razlike u koncentraciji doksorubicina u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima potiču od razlike srednjih poluprečnika mikrovlakana, koji je veći kod HAP/Ca-alginatnih mikrovlakana ($300 \mu\text{m}$ u poređenju sa $250 \mu\text{m}$). Dobijeni rezultati ukazuju na efikasan prenos mase i u Ca-alginatnim i u HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima, sa zanemarljvim difuzionim ograničenjima.

5. DISKUSIJA

Cilj ove doktorske disertacije bio je razvoj i validacija jednostavnog i relevantnog biomimetičnog 3D modela zasnovanog na alginatnim mikrovlaknima, pogodnog za imobilizaciju i gajenje različitih tipova malignih ćelija, sa prvenstvenom namenom za korišćenje u istraživanju malignih tumora i pretkliničkom testiranju antitumorskih lekova.

Potpuno oponašanje složenih bioloških komponenti tumorskog mikrookruženja i dalje predstavlja veliki izazov. Zbog toga se, kao jedan od pristupa, primenjuje koncept inženjerstva tumora, zasnovan na principima inženjerstva tkiva. Inženjerstvo tumora se zasniva na razvoju pojednostavljenih modela koji imaju neke ključne karakteristike određenog tipa tumora i ovaj princip je korišćen za razvoj modela u ovoj doktorskoj disertaciji. Cilj je bio da se razvije jednostavan model na bazi alginatnih mikrovlakana koji omogućava imitaciju 3D mikrookruženja tumora, ne ulazeći u sve karakteristike strukture, a koji je primenljiv za različite tumorske ćelije, uz mogućnost jednostavnih modifikacija po potrebi. Takođe, cilj je bio da metoda bude jednostavna i efikasna i time dostupna većini laboratorija i istraživačima bez posebne tehničke ekspertize. Korišćenjem komercijalno dostupnih materijala kao što su alginat i HAP, kao i osnovne opreme za istiskivanje, značajno se smanjuju troškovi u poređenju sa kompleksnijim modelima i 3D bioštampanjem, što ovaj model čini pogodnim i za veće kapacitete analiza.

Istraživanje je sprovedeno u 3 faze:

1. **u prvoj fazi** izvršena je optimizacija parametara za dobijanje alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama, a zatim i optimizacija uslova gajenja imobilisanih ćelija;
2. **u drugoj fazi** sprovedena je validacija modela kroz kratkotrajno i dugotrajno gajenje malignih ćelija imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima;
3. **u trećoj fazi** ispitana je mogućnost primene modela za testiranje antitumorskih lekova.

U istraživanju je korišćeno više ćelijskih linija i nekoliko standardnih antitumorskih lekova. Ispitivane ćelijske linije uključivale su: ćelije pacovskog glioma C6, ćelije humanog osteosarkoma HOS i U2OS, ćelije mišjeg osteosarkoma K7M2-wt i ćelije humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460. Kao standardni antitumorski lekovi korišćeni su cisplatin, etopozid, vinorelbin i doksorubicin.

U ovoj tezi alginatna mikrovlakana sa imobilisanim malignim ćelijama (prečnik < 1 mm) dobijena su ručnim istiskivanjem rastvora alginata sa suspendovanim ćelijama u rastvor za geliranje. U prethodnim istraživanjima pokazano je da su ćelije karcinoma grlića materice i glioblastoma nakon imobilizacije u alginatna mikrovlakna ručnim istiskivanjem ostale vijabilne i zadržale sposobnost da proliferišu u 3D okruženju (*Stojkowska i sar., 2020; Dragoj i sar., 2021*). Ćelije su imobilisane kao pojedinačne ćelije, a nakon imobilizacije došlo je do promene njihove morfologije u odnosu na 2D kulture. U alginatnim mikrovlaknima ćelije su imale sferičan oblik, dok su u 2D kulturi bile izdužene. Sferična morfologija ćelija je u skladu sa bioinertnom prirodom alginata (*Drozdova i sar., 2024*) i slično morfologiji ćelija u čvrstim tumorima (*Kievit i sar., 2010*). Alginat je izabran kao osnovni materijal za dobijanje mikrovlakana zbog svoje biokompatibilnosti, blagih uslova geliranja i niske cene. Široko je korišćen za imobilizaciju različitih tipova ćelija, uključujući matične ćelije (*Khosravizadeh i sar., 2014; Olderøy i sar., 2014*) i hondrocite (*Bittencourt i sar., 2009*), ali i maligne ćelije (*Stojkowska i sar., 2020; Dragoj i sar., 2021*). Pokazano je da ćelije mišjeg osteosarkoma zadržavaju svoj maligni i metastatski potencijal tokom gajenja u alginatnim česticama (*Akeda i sar., 2009*). Dodatno, ćelije humanog karcinoma dojke gajene u 3D nosačima na bazi alginatnog hidrogela ispoljile su sličan nivo ekspresije markera za pluripotentnost i proliferaciju kao ćelije gajene u Matrigelu, što ukazuje da alginat može imati efekat poput hidrogelova sa složenijim i raznovrsnijim sastavom (*Svanström i sar., 2021*).

Ca-alginatna mikrovlakana sa imobilisanim malignim ćelijama uspešno su dobijena ručnim istiskivanjem suspenzije ćelija u rastvoru Na-alginata, pri čemu su optimizovane početna

koncentracija ćelija u suspenziji i koncentracija rastvora Na-alginata. Pokazano je da je optimalna koncentracija ćelija u suspenziji 4×10^6 ćel cm^{-3} (slika 4.1), a koncentracija rastvora Na-alginata 2,8 mas. % (slika 4.2). Pored Ca-alginatnih mikrovlakana, primenjena metoda omogućila je i razvoj Ba-alginatnih mikrovlakana za imobilizaciju NCI-H460 ćelijske linije, što ukazuje na prilagodljivost alginata kao matrice i procedure istiskivanja za dobijanje različitih tipova mikrovlakana. Naime, Ca-alginatni hidrogel u RPMI medijumu (u kojem se gaji NCI-H460 ćelijska linija) postaje nestabilan, ubrzano bubri i razgrađuje se, što se može povezati sa manjom koncentracijom Ca^{2+} (0,4 mM) i većom koncentracijom PO_4^{3-} jona (5,6 mM) u RPMI medijumu u poređenju sa DMEM medijumom (1,8 mM Ca^{2+} i 0,9 mM PO_4^{3-} , prema podacima proizvođača), budući da fosfatni joni vezuju kalcijum i tako slabe hidrogel. U literaturi su joni Ba^{2+} korišćeni u trećoj fazi umrežavanja alginata kako bi se dobio čvršći hidrogel i pokazano je da dodatno umrežavanje barijumom značajno produžava stabilnost alginatnog hidrogela u medijumu *Minimum Essential Medium* (MEM) sa 3 na više od 11 dana, bez uticaja na vijabilnost ćelija glioma (Tabriz i sar., 2015). Poznato je da Ba^{2+} može biti citotoksičan u velikim koncentracijama, ali njegovi toksični efekti se znatno smanjuju u alginatnom hidrogelu zbog velikog afiniteta alginata prema barijumu, dok se većina neumreženih jona ukloni tokom ispiranja i ćelijske kulture (Alizadeh Sardroud i sar., 2017). Direktno ispitivanje citotoksičnosti Ba^{2+} na ćelijama glioma pokazalo je da 2 minuta izlaganja ćelija rastvoru BaCl_2 u opsegu koncentracije 10–100 mM nije dovelo do negativnih efekata na ćelije, a primećen je i pozitivan efekat jona Ba^{2+} na rast ćelija pri koncentracijama od 60 i 100 mM BaCl_2 (Tabriz i sar., 2015). Geliranje alginata jonima Ba^{2+} pozitivno je uticalo i na proliferaciju ćelija monocitne leukemije, koja se povećala najmanje 1,5 puta u odnosu na geliranje jonima Ca^{2+} (Alizadeh Sardroud i sar., 2017). Ovaj rezultat se može objasniti sposobnošću Ba-alginatnog hidrogela da apsorbuje veće količine proteina iz seruma u odnosu na alginatne hidrogelove umrežene drugim dvovalentnim jonima kao što je Ca^{2+} , što bolje podržava rast ćelija (Alizadeh Sardroud i sar., 2017).

U okviru optimizacije procesa dobijanja Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim NCI-H460 ćelijama ispitivan je uticaj ključnih parametara: koncentracije rastvora Na-alginata i rastvora za geliranje, uslova istiskivanja (unutrašnji prečnik igle i brzina istiskivanja) i dužine geliranja. Pokazano je da je optimalna koncentracija rastvora Na-alginata 2,0 mas. %, a rastvora za geliranje 45 mM Ba^{2+} (slika 4.3). Unutrašnji prečnik igle i dužina geliranja nisu značajno uticali na ćelije (slika 4.4), pa je za dalje eksperimente odabrana veličina igle od 25 G i dužina geliranja od 1 min. Sa druge strane, brzina istiskivanja, odnosno smicajni napon kojem su ćelije izložene, imala je najveći uticaj na vijabilnost ćelija ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije (slika 4.4). Naime, smicajni napon od 23–24 kPa, kojem su ćelije bile izložene pri brzom istiskivanju ćelijske suspenzije kroz igle od 22 i 25 G, imao je izražene negativne efekte na vijabilnost ćelija. Smicajni napon tokom istiskivanja i njegov uticaj na preživljavanje ćelija već duže su predmet intenzivnih istraživanja, a sa savremenim razvojem 3D bioštampanja ovaj parametar je postao jedan od ključnih faktora koje je neophodno optimizovati kako bi se obezbedilo uspešno štampanje 3D modela. Među različitim tehnikama bioštampanja, bioštampanje ekstruzijom je najzastupljenije, ali izlaže ćelije smicajnom naponu (Fischer i sar., 2022).

Poznato je da smicajni napon određenog intenziteta može izazvati značajna oštećenja ćelijske membrane i dovesti do ćelijske smrti. U ovom radu, izlaganje ćelija smicajnom naponu u opsegu 7,8–10 kPa pri umerenoj brzini istiskivanja nije pokazalo vidljive negativne efekte na vijabilnost. Slični rezultati uočeni su i u literaturi, gde je analiziran uticaj smicajnog napona u igli u opsegu 0,7–18 kPa na mišje fibroblaste (L929 ćelijska linija) neposredno nakon bioštampanja (Blaeser i sar., 2015). Pokazano je da smicajni napon manji od 5 kPa nije značajno uticao na preživljavanje ćelija (vijabilnost 96 %), dok je smicajni napon 5–10 kPa doveo do smanjenja vijabilnosti na 91 %, a napon veći od 10 kPa smanjio je vijabilnost na 76 %. U saglasnosti sa tim rezultatima, i u ovoj doktorskoj disertaciji je smicajni napon od 23–24 kPa pri brzom istiskivanju imao izražen negativan efekat na vijabilnost ćelija. Nasuprot ovim rezultatima, u drugoj studiji je pokazano da i relativno mali smicajni napon od 2,5 kPa, ostvaren pri ekstruzionom bioštampanju suspenzije NIH/3T3 fibroblasta (2×10^6 ćel cm^{-3}) u 2 % rastvoru Na-alginata, može dovesti do oštećenja ćelijske membrane i

smanjenja vijabilnosti ćelija na samo 52 % (*Fischer i sar., 2022*). Ova razlika u osetljivosti može biti posledica razlika u tipu ćelija i gustini i viskoznosti suspenzije, što ukazuje na važnost i potrebu optimizacije parametara istiskivanja za svaki pojedinačni slučaj. Sa druge strane, smicajni napon određenog intenziteta može imati i pozitivne efekte na ćelije. Pokazano je da humane mezenhimalne matične ćelije izložene smicajnom naponu do 10 kPa brže proliferišu u poređenju sa ćelijama koje nisu bile izložene smicajnom naponu, dok je izlaganje smicajnom naponu iznad 10 kPa dovelo do smanjenja brzine proliferacije, ukazujući da umereni smicajni napon može stimulirati proliferaciju ćelija, dok veći smicajni napon ima negativan efekat (*Blaeser i sar., 2015*).

Dobijene optimalne koncentracije alginata (2,8 mas. % za Ca-alginatna i 2,0 mas. % za Ba-alginatna mikrovlakna) nalaze se u opsegu koncentracija koje se najčešće koriste za imobilizaciju ćelija ekstruzijom i bioštampanje. Za imobilizaciju ćelija ekstruzijom najčešće se koriste rastvori alginata koncentracije približno 1–3 mas. % (*Li i sar., 2019; Pereira i sar., 2020; Nusterer i sar., 2022*), dok se u bioštampanju često primenjuju nešto veće koncentracije, najčešće 2–4 mas. % (*Mancha Sánchez i sar., 2020*), zbog potrebe za većom viskoznošću rastvora, a zatim i većom stabilnošću odštampanih struktura. Stoga koncentracije korišćene u ovom radu ukazuju na mogućnost primene razvijenog sistema ne samo za ručno istiskivanje, već i za druge metode, uključujući bioštampanje.

Posebna pogodnost alginata i primenjene metode istiskivanja je da u alginatna mikrovlakna mogu da se imobilisuje i druge komponente i agensi kako bi se mikrosredina unapredila i prilagodila određenom tipu tumora. Tako su u eksperimentima sa ćelijskom linijom mišjeg osteosarkoma K7M2-wt razvijena Ca-alginatna mikrovlakna sa inkorporiranim česticama HAP, kako bi se realističnije oponašalo mikrookruženje osteosarkoma. Model je omogućio ispitivanje uticaja ove komponente gajenjem imobilisanih ćelija uporedo u HAP/Ca-alginatnim i Ca-alginatnim mikrovlaknima. HAP je primarna neorganska komponenta kosti i široko se koristi u inženjerstvu kosti za oponašanje prirodno prisutnih minerala (*Shi i sar., 2021*) zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti, osteokonduktivnosti i sposobnosti da podrži osteointegraciju i regeneraciju kosti (*Jeong i sar., 2019*). Porozni nosači na bazi prirodnih polimera sa inkorporiranim česticama HAP korišćeni su za *in vitro* gajenje mezenhimalnih matičnih ćelija (*Prosecka i sar., 2011; Ning i sar., 2015*), preosteoblasta (*Li i sar., 2010; Gleeson i sar., 2010*) i osteoblasta (*Jones i sar., 2010; Zhao i sar., 2002*). Takođe, HAP je našao primenu i u inženjerstvu osteosarkoma, gde je pokazano da nosači na bazi HAP podržavaju infiltraciju i proliferaciju ćelija, ispoljavanje fenotipskih osobina koštanog tkiva i oponašanje niše matičnih ćelija osteosarkoma u *in vitro* uslovima, naglašavajući ključnu ulogu mikrookruženja tumora (*Tornín i sar., 2021; Bassi i sar., 2020*). Pošto se vanćelijski matriks kostiju sastoji od približno jednakih udela organske i neorganske faze (30–40 % i 50–60 %, redom), ovaj odnos je imitiran korišćenjem jednakih početnih koncentracija alginata i HAP od 2 mas.%, koje su se pokazale kao pogodne za ručno istiskivanje i dobijanje mikrovlakana. Iako je početna koncentracija HAP od 2 mas. % prilično mala, u skladu je sa prethodnom studijom koja je ispitivala uticaj prisustva HAP na biologiju osteosarkoma i ćelijski odgovor na lekove, gde je pokazano da koncentracija HAP od 3,5 % (m/v) doprinosi tačnijem oponašanju kinetike rasta i hemorezistencije osteosarkoma *in vivo* u poređenju sa 2D kulturama (*González Díaz i sar., 2022*).

Prenos mase je jedan od ključnih parametara u 3D sistemima za gajenje ćelija. Optimizovana mikrovlakna imala su prečnik u opsegu 500–750 µm, što odgovara relativno malim difuzionim rastojanjima. Ipak, u prvoj eksperimentalnoj studiji ispitana je mogućnost primene protočnog bioreaktora radi potencijalno povoljnih uticaja konvektivnog prenosa mase i hidrodinamičkih smicajnih napona na ćelije. Ćelije pacovskog glioma C6 imobilisane u Ca-alginatnim mikrovlaknima gajene su u statičnim i protočnim uslovima. Analizom eksperimentalnih rezultata uočena je varijabilnost uticaja protoka na ispitivanu ćelijsku liniju pri gajenju u protočnim uslovima. Jedan od uzroka mogu biti različiti pasaži ćelija, jer je poznato je da tokom svakog pasaža dolazi do promena u ćelijskoj morfologiji i fenotipu (*Heinrich i sar., 2015*). U pojedinim eksperimentima, tokom dužih kultura (do 13 dana), uočena je značajno veća proliferacija ćelija u protočnim u odnosu na statične uslove. Pretpostavljeno je da je u statičnim uslovima tokom dužeg gajenja ograničen prenos određene

hranljive materije ili bioaktivnog molekula. Kako bi se razjasnio ovaj efekat, primenom matematičkog modelovanja analiziran je prenos mase potencijalno ograničavajućih susptanci kroz mikrovlakna. Sa jedne strane, ispitan je prenos kiseonika kao malog molekula koji ima ključnu ulogu u proliferaciji ćelija (*Chen i sar., 2009; Gomes i sar., 2016*), dok je sa druge strane analiziran prenos transferina, većeg bioaktivnog molekula prisutnog u fetalnom goveđem serumu, koji bi mogao da podstakne proliferaciju ćelija ukoliko se efikasno doprema.

U cilju razvoja modela prenosa mase u protočnim uslovima, u posebnoj eksperimentalnoj seriji je, na osnovu matematičkog modelovanja otpuštanja srebra, određena intersticijalna brzina medijuma kroz sama mikrovlakna, koja je iznosila $10,2 \text{ nm s}^{-1}$. Ova vrednost je u saglasnosti sa prethodno određenom vrednošću intersticijalne brzine od $4,6 \text{ nm s}^{-1}$ u Ca-alginatnim mikročesticama u pakovanom sloju (*Kostić i sar., 2017*).

Matematičko modelovanje prenosa kiseonika pokazalo je da statični uslovi omogućavaju efikasan prenos gasova i malih molekula sa koeficijntom difuzije reda veličine $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ do svih ćelija imobilisanih u mikrovlaknima pri ispitivanom opsegu koncentracije ćelija do $\sim 9 \times 10^6 \text{ cel g}^{-1}$. U protočnim uslovima, uz intersticijalnu brzinu medijuma kroz hidrogel, doprinos protoka prenosu mase je zanemarljiv. U sledećem koraku modelovan je prenos mase većeg molekula, kao mogućeg uzroka povećane proliferacije ćelija u protočnim uslovima u odnosu na statične. Izabran je transferin, protein odgovoran za transport gvožđa, koji je u fetalnom goveđem serumu prisutan u prilično konstantnoj koncentraciji u opsegu od $1,37$ do $3,72 \text{ mg cm}^{-3}$ (*Hong i sar., 2016*). Pokazano je da transferin ima značajnu ulogu u metabolizmu malignih ćelija (*Shen i sar., 2018*). Takođe, utvrđeno je da receptor za transferin 1 učestvuje u regulaciji fiziologije ćelija glioma, pri čemu akumulacija gvožđa i formiranje reaktivnih kiseoničnih vrsta podstiču proliferaciju ovih ćelija (*Shen i sar., 2018*).

Međutim, modelovanje prenosa transferina je dalo slične rezultate kao u slučaju kiseonika, odnosno pokazano je da statični uslovi obezbeđuju efikasan prenos transferina. Ipak, treba imati u vidu da transferin može da interaguje sa COO^- grupama u alginatnim lancima, što može smanjiti njegovu brzinu difuzije kroz alginatni hidrogel. Dodatno, u jednoj studiji alginat je korišćen za kontrolisano otpuštanje laktoferina, molekula slične strukture kao transferin, koji takođe učestvuje u vezivanju i transportu gvožđa (*Kanwar i sar., 2012; Wally i sar., 2007*). U toj studiji, kada je laktoferin adsorbovan na kalcijum fosfatne nanočestice i prekriven slojevima hitozana i alginata, *in vitro* otpuštanje je trajalo preko 10 h, ukazujući na značajno manju brzinu otpuštanja, sa prividnim koeficijntom difuzije od oko 10^{-19} – $10^{-20} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (*Kanwar i sar., 2012*). Modelovanje prenosa transferina sa pretpostavljenom manjom vrednošću koeficijenta difuzije ($\sim 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) pokazalo je veoma spor prenos mase u statičnim uslovima i da je konvektivni prenos mase neophodan za efikasan transport u alginatnim mikrovlaknima. Naravno, moguće je da je stvarni koeficijent difuzije transferina između vrednosti korišćenih za modelovanje, ili da je neka druga supstanca sličnih karakteristika prenosa zapravo doprinela uočenoj većoj proliferaciji ćelija u protočnim u odnosu na statične uslove.

Sa druge strane, u eksperimentima sa NCI-H460 ćelijskom linijom, protočni uslovi gajenja nisu pokazali pozitivan efekat na ćelije. Vijabilnost ćelija u uslovima kontinualnog protoka bila je slična kao i u statičnim uslovima ili značajno smanjena. Iako je neophodno dodatno ispitati uticaj smicajnih napona tokom gajenja u protočnim uslovima i optimizovati uslove rada u bioreaktoru, rezultati ovog rada pokazali su da za predloženi 3D model nije neophodna upotreba protočnog bioreaktora, s obzirom da statični uslovi omogućavaju uspešno održavanje malignih ćelija u alginatnim mikrovlaknima. Time je 3D model značajno pojednostavljen i učinjen pristupačnijim za širu primenu.

Tokom druge faze istraživanja, u cilju validacije razvijenog 3D modela zasnovanog na alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim malignim ćelijama, ispitana je njegova primenljivost za kratkotrajno i dugotrajno gajenje različitih tipova malignih ćelija u 3D kulturi. Vijabilnost ćelija ispitana je *Live/Dead* metodom, dok su morfološke karakteristike analizirane histološkim metodama, uključujući hematoksilin-eozin (H&E) bojenje, bojenje retikulinskih vlakana i imunofluorescentno

bojenje preseka anti-tubulin antitelom. Metabolička aktivnost ćelija određena je MTT testom, a analiza ekspresije gena *SOX9* korišćena je za procenu promena u fenotipu ćelija.

Ba-alginatna mikrovlakna uspešno su validirana za kratkotrajne kulture jer su podržala kulture NCI-H460 ćelija do 7 dana, dok su Ca-alginatna mikrovlakna omogućila dugotrajne kulture U2OS, HOS i K7M2-wt ćelija, kao i HOS sferoida u periodu od 11 do 21 dana. Takođe, u HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima K7M2-wt ćelije su uspešno gajene do 21 dana.

U svim ispitivanim uslovima, ćelije su ostale žive i metabolički aktivne, nastavile su da proliferišu i formirale su višćelijske agregate u 3D okruženju. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima, u kojima je pokazano da maligne ćelije mogu da proliferišu i formiraju agregate u hidrogelovima na bazi alginata (*Akeda i sar., 2009; Godugu i sar., 2013; Grigore i sar., 2014; Tang i sar., 2017; Wang i sar., 2018b*). Takođe, ćelije su tokom gajenja zadržale morfološke karakteristike tipične za maligne ćelije (slika 4.24). Prisustvo agregata uočeno je kod svih analiziranih ćelijskih linija, osim kod ćelijske linije U2OS. Slično ponašanje U2OS ćelijske linije opisano je u literaturi, gde je pokazano da ove ćelije ne formiraju kompaktne sferoide, već da u uslovima pogodnim za formiranje sferoida dolazi isključivo do stvaranja slabo povezanih ćelijskih agregata. Ovo se može objasniti njihovim diferenciranim fenotipom i odsustvom ključnih transkripcionih faktora povezanih sa osobinama matičnih ćelija (*Quartieri, 2023*).

Prvi agregati uočeni su već 4. dana gajenja, a njihova veličina je rasla tokom vremena. Detaljnom analizom veličine agregata K7M2-wt ćelijske linije pokazano je da agregati mogu dostići prečnik do 210 µm nakon 21 dana gajenja (slika 4.27). Formiranje prvih ćelijskih agregata je takođe uočeno 4. dana i u kulturi ćelija nesitnoćelijskog karcinoma pluća na poroznom alginatnom nosaču (*AlgiMatrixTM*), a do 13. dana agregati su, u zavisnosti od početne koncentracije ćelija, dostizali prečnik 200–250 µm (*Godugu i sar., 2013*). U ovoj disertaciji, ćelije na periferiji agregata bile su žive i delile su se, dok su u centru većih agregata uočene mrtve ćelije, što ukazuje na moguće formiranje nekrotičnog jezgra (slika 4.27). Izražena proliferacija pretežno u perifernim regionima uočena je i u literaturi, u sferoidima karcinoma pluća prečnika 300–400 µm (*Shie i sar., 2023*), dok je u sferoidima osteosarkoma formiranje nekrotičnog jezgra primećeno pri prečnicima iznad 300 µm (*Gebhard i sar., 2016*). Sa druge strane, u ovoj doktorskoj disertaciji, kada su prethodno formirani agregati HOS ćelija imobilisani u alginatna mikrovlakna, nije primećeno nekrotično jezgro tokom 11 dana gajenja, iako su sferoidi bili prečnika ~260 µm (slika 4.22). Ipak, ovaj rezultat treba tumačiti sa rezervom, s obzirom na to da je procena vijabilnosti ćelija zasnovana na *Live/Dead* eseuju i konfokalnoj mikroskopiji. Za pouzdaniju procenu prisustva eventualnih nekrotičnih zona u centralnim delovima sferoida bile bi neophodne detaljnije histološke analize.

Pored sferičnih, zapaženi su i izduženi agregati karakteristične morfologije, sa širim delom („glavom“) usmerenom ka spoljašnjoj ivici mikrovlakana i užim delom („repom“) usmerenim ka osi mikrovlakana (slika 4.28). Slična morfologija agregata opisana je u mikročesticama na bazi alginata i želatina (*Ertekin i sar., 2022*), gde je pokazano da je ovakva morfologija agregata posledica stvaranja mikrokanala tokom formiranja hidrogela i naknadne proliferacije ćelija u tim kanalima. Takođe, pokazano je da je pojava ovakvih izduženih agregata povezana sa invazivnim potencijalom imobilisanih ćelija. U navedenoj studiji, invazivna linija karcinoma dojke formirala je 3 puta više izduženih agregata u poređenju sa neinvazivnom linijom, i 10 puta više u odnosu na endotelne ćelije (*Ertekin i sar., 2022*). U ovoj doktorskoj disertaciji prisustvo izduženih agregata je zapaženo u kulturama ćelijskih linija C6, NCI-H460, HOS i K7M2-wt, koje su u literaturi opisane kao veoma agresivne sa izraženim metastatskim potencijalom (*Khanna i sar., 2000; Kievit i sar., 2010; Kwak i sar., 2014; Chang i sar., 2017; Grisez i sar., 2018*). Ovaj rezultat navodi na zaključak da gajenje u alginatnim mikrovlaknima potencijalno omogućava očuvanje invazivnog potencijala ćelija.

Pored toga, interesantan rezultat dobijen je u dugotrajnim kulturama HOS ćelijske linije u Ca-alginatnim mikrovlaknima, gde su tokom vremena pojedinačne ćelije uglavnom umirale, dok su one u agregatima pretežno ostale žive (slika 4.20). Ovo se može objasniti činjenicom da adherentne ćelije zavise od uspostavljenih veza sa vanćelijskim matriksom, što omogućava održavanje

signalizacije neophodne za preživljavanje ćelija. U odsustvu ovih interakcija dolazi do aktivacije posebnog oblika apoptoze, anoikis, indukovane odvajanjem ćelija od matriksa (*Chiarugi i Giannoni, 2008*). Međutim, ćelije koje formiraju višćelijske agregate mogu da uspostave međućelijske veze i sintetišu sopstveni vanćelijski matriks, čime se delimično ponovo uspostavljaju ključni signalni putevi za preživljavanje. Sa druge strane, pokazano je da metastatske maligne ćelije mogu razviti mehanizme za izbegavanje anoikisa i preživeti u neadherentnim uslovima (*Han i sar., 2023*).

Ćelijski agregati K7M2-wt ćelijske linije u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima detaljnije su ispitani analizom prisustva retikulinskih vlakana. Retikulinska vlakna (retikulin), izgrađena od kolagena tipa III, su važna komponenta vanćelijskog matriksa i često su prisutna u velikim količinama u tumorima, gde utiču na migracioni potencijal ćelija (*Sonzini i sar., 2022*). Prethodna istraživanja pokazala su da je povećana ekspresija retikulina blisko povezana sa progresijom tumora i razvojem metastaza kod karcinoma debelog creva (*Wei i sar., 2017*). Dobijeni rezultati u ovom radu ukazali su na prisustvo retikulinskih vlakana u agregatima u oba tipa mikrovlakana već od 7. dana, pri čemu se do 21. dana formirala dobro definisana mreža, koja je bila nešto izraženija u HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima. Ovaj rezultat se može objasniti prisustvom HAP, koji doprinosi boljem oponašanju sastava vanćelijskog matriksa osteosarkoma u poređenju sa Ca-alginatnim mikrovlaknima bez HAP.

Gajene K7M2-wt ćelije imobilisane u Ca-alginatnim mikrovlaknima su analizirane i u pogledu ekspresije *SOX9* gena. *SOX9* ima ključnu ulogu u diferencijaciji ćelija i razvoju različitih tkiva i organa tokom embrionalnog razvoja, a važan je i za održavanje funkcije tkiva i matičnih ćelija u odrasлом organizmu (*Jo i sar., 2014*). Kod malignih tumora, promena ekspresije *SOX9* povezana je sa njihovim nastajanjem i progresijom, kao i sa rezistencijom na hemioterapiju (*Panda i sar., 2021*). Pokazano je da je *SOX9* prekomerno eksprimiran u agresivnim osteosarkomima, što ukazuje na njegov potencijalni doprinos progresiji osteosarkoma (*Zhu i sar., 2013*). Trend povećane ekspresije *SOX9* u 3D kulturama u poređenju sa 2D, uočen u ovom radu, može ukazivati na to da 3D uslovi gajenja doprinose progresiji osteosarkoma.

Treba naglasiti da dodatak čestica HAP Ca-alginatnim mikrovlaknima svakako doprinosi boljoj imitaciji sastava tkiva kosti u kome se osteosarkom prirodno razvija. Međutim, iz ovih kompozitnih mikrovlakana nije bilo moguće izolovati RNK u dovoljnom prinosu i zadovoljavajućeg kvaliteta. Ovo se može objasniti interakcijama između RNK i HAP čestica zabeleženim u literaturi, gde se pozitivno naelektrisani joni Ca^{2+} na površini HAP vezuju za negativno naelektrisane fosfatne grupe nukleinskih kiselina (*Andrews-Pfannkoch i sar., 2010*). Ove interakcije vezuju nukleinske kiseline iz rastvora, čineći ih nedostupnim za dalje analize. Zbog toga je za primenu ovih mikrovlakana neophodno u narednim koracima unaprediti metodu izolacije RNK, kako bi se poboljšao kvalitet i prinos RNK za dalju analizu.

U celini, druga faza istraživanja je pokazala da alginatna mikrovlakna omogućavaju kako kratkotrajne, tako i dugotrajne kulture različitih tipova malignih ćelija, pri čemu podržavaju njihovu vijabilnost, ispoljavanje morfoloških karakteristika tipičnih za maligne ćelije, proliferaciju, formiranje agregata i sintezu vanćelijskog matriksa. Dodavanje HAP u kulturama osteosarkoma u primenjenoj koncentraciji nije dovelo do statistički značajnih razlika u poređenju sa kulturama bez HAP.

U trećoj fazi istraživanja ispitana je mogućnost primene razvijenog 3D modela za gajenje malignih ćelija u testiranju antitumorskih lekova. Pri tome su primenjeni standardni antitumorski lekovi i poređeni su efekti u 2D i 3D kulturama. U 2D uslovima, sve ćelije su jednako izložene leku, što dovodi do tipičnog, koncentraciono zavisnog odgovora ćelija na lek, odnosno do kontinualnog smanjenja vijabilnosti ćelija sa porastom koncentracije leka. Ovakav odgovor uočen je i u ovom radu, u 2D kulturama NCI-H460 ćelija nakon tretmana cisplatinom i etopozidom, kao i u 2D kulturama K7M2-wt ćelija nakon tretmana doksorubicinom. Sa druge strane, 2D kulture NCI-H460 ćelija nakon tretmana vinorelbinom su pokazale drugačiji trend, pri čemu nije uočeno značajno smanjenje vijabilnosti do koncentracije od oko 10 nM. Međutim, pri koncentraciji od 25 nM došlo je do naglog

pada vijabilnosti, nakon čega je ona ostala približno konstantna do koncentracije 1 μM . Sličan trend opisan je i u analizama kliničkih studija na nesitnoćelijskom karcinomu pluća za pojedine hemioterapeutike, uključujući vinorelbin, gde je pri većim dozama uočen plato (*Stewart i sar., 2007*). Kao moguće objašnjenje navodi se zasićenje ili nedostatak faktora neophodnih za dalje povećanje citotoksičnog efekta, uključujući ograničen broj ćelija u osetljivoj fazi ćelijskog ciklusa. Vrednosti IC_{50} dobijene u ovom radu za cisplatin, etopozid i vinorelbin sa NCI-H460 ćelijskom linijom u 2D uslovima iznosile su približno 1 μM , 0,5–1 μM i 10–25 nM, redom, i bile su u istom opsegu sa prethodno objavljenim vrednostima od 5,7 μM , 4,8 μM i 36,6 nM, redom, iako su korišćeni različiti eksperimentalni pristupi za određivanje citotoksičnosti (*Dinić i sar., 2023*). Nešto manje vrednosti IC_{50} u ovom radu mogu biti posledica dužeg trajanja tretmana (72 h u poređenju sa 24 h u prethodno navedenoj studiji), s obzirom da produženo izlaganje leku može omogućiti snažniji kumulativni efekat, posebno u slučaju lekova koji deluju na DNK, kao što je cisplatin (*Evans i sar., 2019*). Tretman lekovima u koncentracijama koje odgovaraju IC_{30} vrednosti nije uticao na ekspresiju *MDR1*, *ABCC1* i *ABCG2* gena u 2D kulturama, osim u slučaju vinorelbina, koji je doveo do povećane ekspresije *ABCG2*. U studiji Dinić i sar. (2023) takođe su zabeležene promene u ekspresiji ABC transportera nakon tretmana navedenim lekovima, pri čemu je u njihovom radu analiziran proteinski nivo ekspresije, dok je u ovom istraživanju ispitivana ekspresija na nivou mRNA. Pored toga, u navedenoj studiji primenjen je širi opseg koncentracija (cisplatin 5–15 μM , etopozid 10–30 μM , vinorelbin 100–1000 nM), dok je u ovom radu analiziran efekat jedne koncentracije koja odgovara IC_{30} vrednosti.

Poseban deo ove doktorske disertacije posvećen je primeni hemijsko-inženjerskih principa i evaluaciji uticaja prenosa mase na rezultate ispitivanja antitumorskih lekova u razvijenom 3D modelu. Naime, odgovor ćelija na antitumorske lekove u 3D modelima može značajno zavisiti od brzine transporta leka kroz tumorsko mikrokruženje. Ključna razlika između 3D modela zasnovanih na sferoidima i onih koji koriste hidrogelove ili porozne nosače sa pojedinačnim ćelijama ogleda se u penetraciji leka, jer sferoidi obično imaju znatno manju propustljivost (*Lin i sar., 2022*). Ispitivanje potrošnje doksorubicina u sferoidima nesitnoćelijskog karcinoma pluća (veličine 100–300 μm) pokazalo je da je samo mali deo dostupnog leka (~10,5 %) prisutan unutar sferoida (*Godugu i sar., 2013*). Sa druge strane, nosači takođe mogu ograničiti difuziju lekova zbog svoje veličine ili strukture, što može uticati na pouzdanost dobijenih rezultata (*Komez i sar., 2020*). Zbog toga je važno ispitati efikasnost transporta lekova u 3D modelima, što se može ostvariti različitim metodama, uključujući fluorescentne testove difuzije i permeabilnosti lekova (*Monteiro i sar., 2021; Lin i sar., 2022*). U ovom radu korišćeno je matematičko modelovanje prenosa mase kroz alginatna mikrovlakna, a kao reprezentativan primer modelovan je prenos doksorubicina kroz Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakna. Matematičko modelovanje difuzije doksorubicina ukazalo je na efikasan prenos leka u oba 3D modela, potvrđujući uniformnu dostupnost leka svim ćelijama, koje su u trenutku tretmana i dalje prisutne kao pojedinačne ćelije. Stoga se bilo kakve razlike u osetljivosti ćelija na lekove između 2D i 3D kultura sa sigurnošću mogu pripisati isključivo biološkim faktorima, a ne ograničenjima u transportu leka kroz hidrogel.

IC_{50} vrednost u 3D kulturi NCI-H460 ćelija u ovom radu nakon tretmana cisplatinom u toku 72 h je bila između 25 i 50 μM u oba slučaja, odnosno kada je tretman sproveden 24 h i 96 h nakon imobilizacije. Stoga, ćelije u 3D modelu su bile približno 25–50 puta rezistentnije u odnosu na ćelije u 2D kulturi. Sličan odnos vrednosti IC_{50} u 3D i 2D kulturi NCI-H460 ćelija dobijen je u nosaču *AlgiMatrixTM* pri tri uzastopna tretmana ćelija cisplatinom u trajanju od 24 h (*Godugu i sar., 2013*). U ovoj doktorskoj disertaciji tretman cisplatinom doveo je povećane ekspresije *MDR1* i *ABCG2* gena, a slično je uočeno i u literaturi, u 3D modelu zdravog plućnog tkiva nakon tretmana cisplatinom (*Vesel i sar. 2017*).

U 3D kulturama NCI-H460 ćelija etopozid je smanjio relativnu vijabilnost na ~58 % pri koncentraciji od 5 μM , dok dalje povećanje koncentracije nije izazvalo statistički značajnu promenu, već je uočen plato u opsegu 5–500 μM . S obzirom da nije uočena povećana ekspresija *MDR1*, *ABCC1* i *ABCG2*

gena, rezistencija u 3D kulturi verovatno nije rezultat pojačanog efluksa leka, već se nastanak platoa može objasniti time da lek već postiže maksimalni efekat na osetljive ćelije, odnosno ćelije koje proliferišu, pri nižoj koncentraciji. Dalje povećanje doze ne može dodatno da smanji vijabilnost jer deo ćelija koji se ne deli ostaje neosetljiv. IC_{50} vrednost za etopozid u 3D kulturi nije dostignuta, što ukazuje na izraženiju rezistenciju u poređenju sa 2D kulturom. Slično je zabeleženo i u literaturi, gde je vrednost IC_{50} za ćelijsku liniju karcinoma pluća A549, koja se često koristi kao model nesitnoćelijskog karcinoma pluća, nakon tretmana etopozidom bila ~23 puta veća u 3D nego u 2D kulturi (Keeratichamroen i sar., 2023).

Kada su NCI-H460 ćelije u 3D kulturi tretirane vinorelbinom, vrednost IC_{50} nije dostignuta u opsegu primenjenih koncentracija (1–1000 nM), a ekspresija *ABCC1* gena je nakon tretmana bila povećana. Ovi rezultati takođe su ukazali na veću rezistenciju 3D kultura u odnosu na 2D kulture, što je donekle u suprotnosti sa studijom u literaturi, gde se citotoksičnost vinorelbina u 3D višćelijskim sferoidima nesitnoćelijskog karcinoma pluća nije značajno razlikovala u odnosu na 2D kulturu (Gamerith i sar., 2015). Ova razlika se može objasniti razlikama u 3D modelima, s obzirom na to da su u ovoj doktorskoj disertaciji ćelije bile imobilisane kao pojedinačne ćelije unutar alginatnog hidrogela, dok su u navedenoj studiji korišćeni već formirani višćelijski sferoidi, što može dovesti do različitog odgovora ćelija na tretman.

2D i 3D kulture K7M2-wt ćelija tretirane doksorubicinom pokazale su različitu osetljivost na lek. U 3D kulturama, vrednosti IC_{50} za Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakna bile su statistički slične, između 2 i 3 $\mu\text{g cm}^{-3}$, što je 4–6 puta veće nego vrednosti određene u 2D kulturi. Slično, veća rezistencija ćelija osteosarkoma (MG-63) u 3D hidrogelu na bazi želatina u odnosu na 2D kulturu zabeležena je i u literaturi, pri čemu je u toj studiji dodatak HAP u 3D model dodatno povećao rezistenciju na doksorubicin (González Díaz i sar., 2022). Mogući razlog ove razlike uticaja HAP na rezistenciju ćelija može biti kako njegova koncentracija, tako i tip ćelija, što ukazuje da bi druga koncentracija HAP u modelu razvijenom u ovoj disertaciji mogla da dovede do drugačijeg efekta.

Sumirajući rezultate ispitivanja antitumorskih lekova, može se zaključiti da su ćelije gajene u 3D modelu bile znatno rezistentnije u odnosu na one gajene u 2D kulturama, što je u skladu sa smanjenom osetljivošću na hemioterapiju kod pacijenata i ukazuje na potencijal primene razvijenog 3D modela za evaluaciju efikasnosti antitumorskih lekova.

6. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije uspešno je razvijen i validiran jednostavan biomimetički 3D model zasnovan na alginatnim mikrovlaknama sa imobilisanim ćelijama za primenu u istraživanju malignih tumora i prekliničkom ispitivanju antitumorskih lekova. Model je omogućio gajenje različitih tipova malignih ćelija uz minimalne modifikacije, pa se tako za gajenje ćelija osteosarkoma u alginatni hidrogel mogu inkorporirati čestice hidroksiapatita (HAP), dok se za gajenje ćelija koje zahtevaju RPMI medijum mogu koristiti Ba-alginatna umesto Ca-alginatnih mikrovlakana radi veće stabilnosti hidrogela. Razvijeni model koristi komercijalno dostupne materijale (alginat i HAP čestice) i zasniva se na jednostavnoj metodi, čime se obezbeđuje efikasan proces proizvodnje dostupan većini laboratorija bez potrebe za specijalizovanom tehničkom ekspertizom. Jednostavnost i isplativost ovog pristupa, u poređenju sa naprednim nosačima i tehnikama bioštampanja, čine ga pogodnim za sprovođenje analiza većeg kapaciteta koje su od ključnog značaja za istraživanja malignih tumora i razvoj antitumorskih lekova.

U prvom delu disertacije definisani su sastavi suspenzije i optimalni parametri za dobijanje alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama, kao i optimalni uslovi gajenja imobilisanih ćelija. Na osnovu rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci.

- Ručnim istiskivanjem suspenzija različitih malignih ćelija u rastvoru Na-alginata u rastvor za geliranje sa Ca^{2+} i Ba^{2+} jonima (180 mM Ca^{2+} i 45–180 mM Ba^{2+}) mogu se dobiti mikrovlakna prečnika približno 400–750 μm .
- Umerena brzina istiskivanja rastvora sa izračunatim vrednostima smicajnog napona u opsegu 7,8–10 kPa nema negativne efekte na vijabilnost ćelija, dok brzo istiskivanje rastvora sa izračunatim vrednostima smicajnog napona u opsegu 23–24 kPa ima izražen negativan efekat na vijabilnost ćelija, što navodi na zaključak da postoji granična vrednost smicajnog napona iznad koje dolazi do značajnog oštećenja ćelija.
- Kao optimalni parametri za dobijanje Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama (ćelijske linije humanog osteosarkoma HOS i U2OS i glioma pacova C6) određeni su: 2,8 mas. % rastvor Na-alginata, koncentracija ćelija od 4×10^6 ćel cm^{-3} , rastvor za geliranje sa 180 mM Ca^{2+} , veličina igle od 25 G i vreme geliranja od 15 min. Za dobijanje HAP/Ca-alginatnih i Ca-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama mišjeg osteosarkoma K7M2-wt korišćen je 2 mas. % rastvor Na-alginata sa ili bez 2 mas. % HAP, dok su ostali parametri bili isti.
- Kao optimalni parametri za dobijanje Ba-alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama humanog nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 određeni su: 2 mas. % rastvor Na-alginata, koncentracija ćelija od 4×10^6 ćel cm^{-3} , rastvor za geliranje sa 45 mM Ba^{2+} , veličina igle od 25 G, vreme geliranja od 1 min i umerena brzina istiskivanja.
- Uticaj protoka medijuma u protočnom bioreaktoru na ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknama zavisi od tipa ćelija i uslova gajenja, pri čemu može dovesti do povećanja, smanjenja ili odsustva promena u proliferaciji ćelija u poređenju sa statičnim kulturama. Pri tome je pokazano da deo fluida prolazi kroz hidrogel intersticijalnom brzinom od $\sim 10 \text{ nm s}^{-1}$, što dodatno može da bude razlog za uočene razlike u rezultatima.
- Matematičkim modelovanjem prenosa mase kroz alginatna mikrovlakna pokazano je da su protočni uslovi neophodni za prenos molekula sa malim koeficijentom difuzije reda velične $\sim 10^{-19} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Međutim, eksperimentalna istraživanja su pokazala da za razvijeni 3D model nisu neophodni protočni uslovi jer statični uslovi omogućavaju uspešno gajenje ispitivanih malignih ćelija (osteosarkoma, glioma i nesitnoćelijskog plućnog karcinoma).

U drugom delu disertacije razvijeni 3D model je validiran za kratkotrajno i dugotrajno gajenje različitih malignih ćelija u alginatnim mikrovlaknima, na osnovu čega se mogu izvesti sledeći zaključci.

- Ba-alginatna mikrovlakna podržavaju kratkotrajne kulture NCI-H460 ćelija (do 7 dana), Ca-alginatna mikrovlakna omogućavaju dugotrajne kulture U2OS, HOS i K7M2-wt ćelija, kao i HOS sferoida (11–21 dana), a u HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima se mogu uspešno gajiti K7M2-wt ćelije do 21 dana.
- Ćelije gajene u alginatnim mikrovlaknima ostaju žive i metabolički aktivne, zadržavaju morfološke karakteristike tipične za maligne ćelije, nastavljaju da proliferišu i formiraju agregate.
- Prvi agregati u kulturi K7M2-wt ćelija u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima uočljivi su već 4. dana gajenja, a do 21. dana mogu dostići prečnik od 210 μm , pri čemu se ćelije na periferiji velikih agregata aktivno dele, dok neke ćelije u centru umiru, ukazujući na mogućnost razvoja nekrotičnog jezgra.
- Prisustvo izduženih agregata tokom celokupnog vremena gajenja ukazuje da alginatna mikrovlakna omogućavaju remodelovanje agregata prema dostupnom prostoru, što može ukazati na očuvanje invazivnosti gajenih malignih ćelija.
- Ca-alginatna i HAP/Ca-alginatna mikrovlakna podržavaju formiranje agregata K7M2-wt ćelija u produženoj kulturi do 21 dana uz sintezu retikulinskih vlakana koja formiraju dobro definisanu mrežu, što ukazuje na progresiju tumora i podržavanje metastatskog potencijala ćelija.
- Trend povećane ekspresije *SOX9* u 3D kulturama K7M2-wt ćelija u poređenju sa 2D ukazuje na to da 3D uslovi gajenja bolje reprodukuju molekularne karakteristike povezane sa progresijom osteosarkoma.
- Prisustvo HAP u alginatnim mikrovlaknima ometa izolaciju RNK, te je potrebno unapređenje metode kako bi se poboljšao kvalitet i prinos RNK za dalju analizu.

U trećoj fazi disertacije ispitana je mogućnost primene razvijenog modela za testiranje antitumorskih lekova, na osnovu čega se mogu izvesti sledeći zaključci.

- Dobijene su značajno veće vrednosti IC_{50} u 3D kulturama u poređenju sa 2D kulturama nakon tretmana standardnim antitumorskim lekovima (cisplatin, etopozid, vinorelbin i doksorubicin), što ukazuje na izraženiju rezistenciju ćelija gajenih u 3D kulturama.
- Prekomerna ekspresija ABC transportera (*MDR1*, *ABCC1* i *ABCG2*) nakon tretmana cisplatinom i vinorelbinom ukazuje na razvoj multirezistencije u 3D kulturi NCI-H460 ćelija, dok nepromenjena ekspresija ovih gena nakon tretmana etopozidom ukazuje na neki drugi mehanizam rezistencije.
- 3D model za gajenje malignih ćelija na bazi alginatnih mikrovlakana omogućava efikasnu i uniformnu dostavu leka do svih ćelija unutar hidrogela, što je potvrđeno matematičkim modelovanjem prenosa doksorubicina u Ca-alginatnim i HAP/Ca-alginatnim mikrovlaknima sa pojedinačnim K7M2-wt ćelijama. Stoga se razlike u osetljivosti ćelija na lekove između 2D i 3D kultura mogu pripisati isključivo biološkim faktorima, a ne ograničenjima u transportu leka kroz hidrogel.

Ova doktorska disertacija ima naučni doprinos u vidu razvoja biomimetičnog 3D modela za koji je pokazano da se može koristiti za gajenje različitih tipova malignih ćelija, omogućavajući nova saznanja o formiranju višćelijskih agregata malignih ćelija, sintezi vanćelijskog matriksa i razvoju rezistencije na lekove. Takođe, disertacija ima i praktični doprinos, jer razvijeni 3D model može poslužiti kao alat za pouzdanu i relevantnu evaluaciju antitumorskih lekova u prekliničkim ispitivanjima, budući da bolje imitira *in vivo* odgovor ćelija na lekove u poređenju sa 2D modelom, čime može doprineti smanjenju obima eksperimenata na životinjama.

7. LITERATURA

- Aarstad, O. A., Tøndervik, A., Sletta, H., & Skjåk-Bræk, G. (2012). Alginate sequencing: an analysis of block distribution in alginates using specific alginate degrading enzymes. *Biomacromolecules*, 13(1), 106-116. <https://doi.org/10.1021/bm2013026>
- Abuwatfa, W. H., Pitt, W. G., & Hussein, G. A. (2024). Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *Journal of Biomedical Science*, 31(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-00994-y>
- Ahir, B. K., Engelhard, H. H., & Lakka, S. S. (2020). Tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: glioblastoma. *Molecular neurobiology*, 57(5), 2461-2478. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01892-8>
- Aisen, P., & Listowsky, I. (1980). Iron transport and storage proteins. *Annual review of biochemistry*, 49(1), 357-393. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.002041>
- Akeda, K., Nishimura, A., Satonaka, H., Shintani, K., Kusuzaki, K., Matsumine, A., Kasai, Y., Masuda, K., & Uchida, A. (2009). Three-dimensional alginate spheroid culture system of murine osteosarcoma. *Oncology reports*, 22(5), 997-1003. https://doi.org/10.3892/or_00000527
- Alizadeh Sardroud, H., Nemati, S., Baradar Khoshfetrat, A., Nabavinia, M., & Beygi Khosrowshahi, Y. (2017). Barium-cross-linked alginate-gelatin microcapsule as a potential platform for stem cell production and modular tissue formation. *Journal of microencapsulation*, 34(5), 488-497. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1354940>
- Al-Husinat, L. I., Azzam, S., Al Sharie, S., Al Sharie, A. H., Battaglini, D., Robba, C., Marini, J. J., Thornton, L. T., Cruz, F. F., Silva, P. L., & Rocco, P. R. (2024). Effects of mechanical ventilation on the interstitial extracellular matrix in healthy lungs and lungs affected by acute respiratory distress syndrome: a narrative review. *Critical Care*, 28(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s13054-024-04942-y>
- Al-Musa, S., Fara, D. A., & Badwan, A. A. (1999). Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *Journal of controlled release*, 57(3), 223-232. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00096-0](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00096-0)
- Altorki, N. K., Markowitz, G. J., Gao, D., Port, J. L., Saxena, A., Stiles, B., McGraw, T., & Mittal, V. (2019). The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 19(1), 9-31. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0081-9>
- Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M. (2015). 3D cell culture in alginate hydrogels. *Microarrays*, 4(2), 133-161. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current biology*, 30(16), R921-R925.
- Andrews-Pfannkoch, C., Fadrosch, D. W., Thorpe, J., & Williamson, S. J. (2010). Hydroxyapatite-mediated separation of double-stranded DNA, single-stranded DNA, and RNA genomes from natural viral assemblages. *Applied and environmental microbiology*, 76(15), 5039-5045. <https://doi.org/10.1128/AEM.00204-10>
- Anselme, K., & Biggerelle, M. (2011). Role of materials surface topography on mammalian cell response. *International Materials Reviews*, 56(4), 243-266. <https://doi.org/10.1179/1743280411Y.0000000001>
- Ao, Z., Cai, H., Wu, Z., Song, S., Karahan, H., Kim, B., Lu, H.-C., Kim, J., Mackie, K., & Guo, F. (2021). Tubular human brain organoids to model microglia-mediated neuroinflammation. *Lab on a Chip*, 21(14), 2751-2762. <https://doi.org/10.1039/d1lc00030f>

- Arai, K., Sakamoto, R., Kubota, D., & Kondo, T. (2013). Proteomic approach toward molecular backgrounds of drug resistance of osteosarcoma cells in spheroid culture system. *Proteomics*, 13(15), 2351-2360. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300053>
- Arandhara, A., Bhuyan, P., & Das, B. K. (2025). Exploring lung cancer microenvironment: pathways and nanoparticle-based therapies. *Discover Oncology*, 16(1), 159. <https://doi.org/10.1007/s12672-025-01902-y>
- Arneth, B. (2019). Tumor microenvironment. *Medicina*, 56(1), 15. <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>
- Asghar, W., El Assal, R., Shafiee, H., Pitteri, S., Paulmurugan, R., & Demirci, U. (2015). Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Materials today*, 18(10), 539-553. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.05.002>
- Augst, A. D., Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular bioscience*, 6(8), 623-633. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>
- Avena, P., Zavaglia, L., Casaburi, I., & Pezzi, V. (2025). Perfusion Bioreactor Technology for Organoid and Tissue Culture: A Mini Review. *Onco*, 5(2), 17. <https://doi.org/10.3390/onco5020017>
- Bai, L., Hao, Z., Wang, S., Zhou, J., Yao, S., Pei, N., Zhu, H., Zhang, K., Reis, R. L., Oliveira, J. M., He, J., Li, D., Mao, X., & Wang, L. (2023). Biomimetic three-dimensional glioma model printed in vitro for the studies of glioma cells and neurons interactions. *International Journal of Bioprinting*, 9(4), 715. <https://doi.org/10.18063/ijb.715>
- Baino, F., Novajra, G., & Vitale-Brovarone, C. (2015). Bioceramics and scaffolds: a winning combination for tissue engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 202. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00202>
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science*, 125(23), 5591-5596. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>
- Bancroft, J. D., & Layton, C. (2018). Connective and other mesenchymal tissues with their stains. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book*, 153.
- Banicevic, I., Milosevic, M., Petrovic, J., Milivojevic, M., Gasik, M., Stojkovska, J., & Obradovic, B. (2025). Macroporous alginate scaffolds with calcium phosphate filler as a 3D in vitro microenvironment supporting bone cancer cells. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 75(7), 820-834. <https://doi.org/10.1080/00914037.2025.2608101>
- Bassi, G., Panseri, S., Dozio, S. M., Sandri, M., Campodoni, E., Dapporto, M., Sprio, S., Tampieri, A., & Montesi, M. (2020). Scaffold-based 3D cellular models mimicking the heterogeneity of osteosarcoma stem cell niche. *Scientific Reports*, 10(1), 22294. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79448-y>
- Becker, T. A., & Kipke, D. R. (2002). Flow properties of liquid calcium alginate polymer injected through medical microcatheters for endovascular embolization. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 61(4), 533-540. <https://doi.org/10.1002/jbm.10202>
- Beird, H. C., Bielack, S. S., Flanagan, A. M., Gill, J., Heymann, D., Janeway, K. A., Livingston, J. A., Roberts, R. D., Strauss, S. J., & Gorlick, R. (2022). Osteosarcoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 8(1), 77. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00409-y>
- Bittencourt, R. A. D. C., Pereira, H. R., Felisbino, S. L., Ferreira, R. R., Guilherme, G. R. B., Moroz, A., & Deffune, E. (2009). Chondrocyte cultures in tridimensional scaffold: alginate hydrogel. *Acta Ortopédica Brasileira*, 17, 242-246. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522009000400011>

- Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M., & Fischer, H. (2015). Controlling shear stress in 3D bioprinting is a key factor to balance printing resolution and stem cell integrity. *Advanced healthcare materials*, 5(3), 326-333. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500677>
- Bojorges, H., López-Rubio, A., Martínez-Abad, A., & Fabra, M. J. (2023). Overview of alginate extraction processes: Impact on alginate molecular structure and techno-functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 140, 104142. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104142>
- Braccini, S., Tacchini, C., Chiellini, F., & Puppi, D. (2022). Polymeric hydrogels for in vitro 3D ovarian cancer modeling. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3265. <https://doi.org/10.3390/ijms23063265>
- Brancato, V., Oliveira, J. M., Correlo, V. M., Reis, R. L., & Kundu, S. C. (2020). Could 3D models of cancer enhance drug screening?. *Biomaterials*, 232, 119744. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119744>
- Bregenzer, M. E., Horst, E. N., Mehta, P., Novak, C. M., Raghavan, S., Snyder, C. S., & Mehta, G. (2019). Integrated cancer tissue engineering models for precision medicine. *PloS one*, 14(5), e0216564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216564>
- Broekman, M. L., Maas, S. L., Abels, E. R., Mempel, T. R., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2018). Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nature Reviews Neurology*, 14(8), 482-495. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0025-8>
- Buckwalter, J. A., & Cooper, R. R. (1987). Bone structure and function. *Instructional course lectures*, 36, 27-48.
- Burgstaller, G., Oehrle, B., Gerckens, M., White, E. S., Schiller, H. B., & Eickelberg, O. (2017). The instructive extracellular matrix of the lung: basic composition and alterations in chronic lung disease. *European Respiratory Journal*, 50(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.01805-2016>
- Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature methods*, 13(5), 405-414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>
- Capasso, A. (2012). Vinorelbine in cancer therapy. *Current drug targets*, 13(8), 1065-1071. <https://doi.org/10.2174/138945012802009017>
- Carletti, E., Motta, A., & Migliaresi, C. (2010). Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, 17-39. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2
- Carlsson, J., Nilsson, K., Westermarck, B., Pontén, J., Sundström, C., Larsson, E., Bergh, J., Pålman, S., Busch, C., & Collins, V. P. (1983). Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *International journal of cancer*, 31(5), 523-533. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910310502>Digital Object Identifier (DOI)
- Cavo, M., Caria, M., Pulsoni, I., Beltrame, F., Fato, M., & Scaglione, S. (2018). A new cell-laden 3D Alginate-Matrigel hydrogel resembles human breast cancer cell malignant morphology, spread and invasion capability observed “in vivo”. *Scientific Reports*, 8(1), 5333. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23250-4>
- Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug design, development and therapy*, 1911-1922. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal*, 17(Suppl 4), 467-479. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>

- Chang, P. Y., Hsieh, M. J., Hsieh, Y. S., Chen, P. N., Yang, J. S., Lo, F. C., Yang, S. F., & Lu, K. H. (2017). Tricetin inhibits human osteosarcoma cells metastasis by transcriptionally repressing MMP-9 via p38 and Akt pathways. *Environmental Toxicology*, 32(8), 2032-2040. <https://doi.org/10.1002/tox.22380>
- Chaudhuri, P. K., Pan, C. Q., Low, B. C., & Lim, C. T. (2016). Topography induces differential sensitivity on cancer cell proliferation via Rho-ROCK-Myosin contractility. *Scientific Reports*, 6(1), 19672. <https://doi.org/10.1038/srep19672>
- Chen, Y., Cairns, R., Papandreou, I., Koong, A., & Denko, N. C. (2009). Oxygen consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect. *PloS one*, 4(9), e7033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007033>
- Chiarugi, P., & Giannoni, E. (2008). Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical pharmacology*, 76(11), 1352-1364. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.023>
- Ciechanover, A., Schwartz, A. L., Dautry-Varsat, A., & Lodish, H. F. (1983). Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *Journal of Biological Chemistry*, 258(16), 9681-9689. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44551-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44551-0)
- Contessi Negrini, N., Ricci, C., Bongiorno, F., Trombi, L., D'Alessandro, D., Danti, S., & Farè, S. (2022). An osteosarcoma model by 3D printed polyurethane scaffold and in vitro generated bone extracellular matrix. *Cancers*, 14(8), 2003. <https://doi.org/10.3390/cancers14082003>
- Dadgar, N., Gonzalez-Suarez, A. M., Fattahi, P., Hou, X., Weroha, J. S., Gaspar-Maia, A., Stybayeva, G., & Revzin, A. (2020). A microfluidic platform for cultivating ovarian cancer spheroids and testing their responses to chemotherapies. *Microsystems & nanoengineering*, 6(1), 93. <https://doi.org/10.1038/s41378-020-00201-6>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature reviews Clinical oncology*, 15(2), 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>
- Dai, X., Ma, C., Lan, Q., & Xu, T. (2016). 3D bioprinted glioma stem cells for brain tumor model and applications of drug susceptibility. *Biofabrication*, 8(4), 045005. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/4/045005>
- Davarcı, F., Turan, D., Ozcelik, B., & Poncelet, D. (2017). The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocolloids*, 62, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.029>
- Day, C. P., Merlino, G., & Van Dyke, T. (2015). Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell*, 163(1), 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.068>
- Degerstedt, O., Gråsjö, J., Norberg, A., Sjögren, E., Hansson, P., & Lennernäs, H. (2022). Drug diffusion in biomimetic hydrogels: importance for drug transport and delivery in non-vascular tumor tissue. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 172, 106150. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106150>
- De Luca, A., Raimondi, L., Salamanna, F., Carina, V., Costa, V., Bellavia, D., Alessandro, R., Fini, M., & Giavaresi, G. (2018). Relevance of 3d culture systems to study osteosarcoma environment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0663-5>
- Del Gaudio, P., Colombo, P., Colombo, G., Russo, P., & Sonvico, F. (2005). Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling. *International journal of pharmaceutics*, 302(1-2), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.041>

- del Rocío Aguilera-Marquez, J., Manzanares-Guzmán, A., García-Uriostegui, L., Canales-Aguirre, A. A., Camacho-Villegas, T. A., & Lugo-Fabres, P. H. (2025). Alginate–Gelatin Hydrogel Scaffold Model for Hypoxia Induction in Glioblastoma Embedded Spheroids. *Gels*, 11(4), 263. <https://doi.org/10.3390/gels11040263>
- Dinić, J., Podolski-Renić, A., Dragoj, M., Jovanović Stojanov, S., Stepanović, A., Lupšić, E., Pajović, M., Jovanović, M., Petrović Rodić, D., Marić, D., Ercegovic, M., & Pešić, M. (2023). Immunofluorescence-Based Assay for High-Throughput Analysis of Multidrug Resistance Markers in Non-Small Cell Lung Carcinoma Patient-Derived Cells. *Diagnostics*, 13(24), 3617. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13243617>
- Doctor, A., Seifert, V., Ullrich, M., Hauser, S., & Pietzsch, J. (2020). Three-dimensional cell culture systems in radiopharmaceutical cancer research. *Cancers*, 12(10), 2765. <https://doi.org/10.3390/cancers12102765>
- Donati, I., Holtan, S., Mørch, Y. A., Borgogna, M., Dentini, M., & Skjåk-Bræk, G. (2005). New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium–alginate gels. *Biomacromolecules*, 6(2), 1031-1040. <https://doi.org/10.1021/bm049306e>
- Draget, K. I., Skjåk-Bræk, G., & Smidsrød, O. (1997). Alginate based new materials. *International journal of biological macromolecules*, 21(1-2), 47-55. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(97\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)00040-8)
- Draget, K. I. (2009). Alginates. In *Handbook of hydrocolloids* (pp. 807-828). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.807>
- Dragoj, M., Stojkowska, J., Stanković, T., Dinić, J., Podolski-Renić, A., Obradović, B., & Pešić, M. (2021). Development and validation of a long-term 3D glioblastoma cell culture in alginate microfibers as a novel bio-mimicking model system for preclinical drug testing. *Brain Sciences*, 11(8), 1025. <https://doi.org/10.3390/brainsci11081025>
- Drozdova, M., Makhonina, A., Gladkikh, D., Artyukhov, A., Bryukhanov, L., Mezhuev, Y., Lozinsky, V., & Markvicheva, E. (2024). Hydroxyapatite-loaded macroporous calcium alginate hydrogels: Preparation, characterization, and in vitro evaluation. *Biopolymers*, 115(4), e23583. <https://doi.org/10.1002/bip.23583>
- Dundar, B., Markwell, S. M., Sharma, N. V., Olson, C. L., Mukherjee, S., & Brat, D. J. (2020). Methods for in vitro modeling of glioma invasion: Choosing tools to meet the need. *Glia*, 68(11), 2173-2191. <https://doi.org/10.1002/glia.23813>
- Eaton, B. R., Schwarz, R., Vatner, R., Yeh, B., Claude, L., Indelicato, D. J., & Laack, N. (2021). Osteosarcoma. *Pediatric blood & cancer*, 68, e28352. <https://doi.org/10.1002/pbc.28352>
- Eliasz, R. E., Nir, S., Marty, C., & Szoka Jr, F. C. (2004). Determination and modeling of kinetics of cancer cell killing by doxorubicin and doxorubicin encapsulated in targeted liposomes. *Cancer research*, 64(2), 711-718. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-0654>
- Ertekin, Ö., Monavari, M., Krüger, R., Fuentes-Chandía, M., Parma, B., Letort, G., Tripal, A. R., Boccaccini, A. K., Bosserhoff, P. Ceppi, M. Kappelmann-Fenzl & Leal-Egaña, A. (2022). 3D hydrogel-based microcapsules as an in vitro model to study tumorigenicity, cell migration and drug resistance. *Acta Biomaterialia*, 142, 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.02.010>
- Evans, D. M., Fang, J., Silvers, T., Delosh, R., Laudeman, J., Ogle, C., Reinhart, R., Selby, M., Bowles, L., Connelly, J., Harris, E., Krushkal, J., Rubinstein, L., Doroshov, J. H., & Teicher, B. A. (2019). Exposure time versus cytotoxicity for anticancer agents. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 84(2), 359-371. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-03863-w>
- Fan, Y., Tao, T., Guo, Z., To, K. K. W., Chen, D., Wu, S., Yang, C., Li, J., Luo, M., Wang, F., & Fu, L. (2022). Lazertinib improves the efficacy of chemotherapeutic drugs in ABCB1 or ABCG2

- overexpression cancer cells in vitro, in vivo, and ex vivo. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 24, 636-649. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.02.006>
- Fong, E. L., Harrington, D. A., Farach-Carson, M. C., & Yu, H. (2016). Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. *Biomaterials*, 108, 197-213. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.052>
- Fischer, L., Nosratlo, M., Hast, K., Karakaya, E., Ströhlein, N., Esser, T. U., Gerum, R., Richter, S., Engel, F. B., Detsch, R., Fabry, B. & Thievensen, I. (2022). Calcium supplementation of bioinks reduces shear stress-induced cell damage during bioprinting. *Biofabrication*, 14(4), 045005. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac84af>
- Fitzgerald, K. A., Malhotra, M., Curtin, C. M., O'Brien, F. J., & O'Driscoll, C. M. (2015). Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *Journal of controlled release*, 215, 39-54. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.020>
- Florczyk, S. J., Wang, K., Jana, S., Wood, D. L., Sytsma, S. K., Sham, J. G., Kievit, F. M., & Zhang, M. (2013). Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM. *Biomaterials*, 34(38), 10143-10150. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.034>
- Fojo, A., Hamilton, T. C., Young, R. C., & Ozols, R. F. (1987). Multidrug resistance in ovarian cancer. *Cancer*, 60(S8), 2075-2080. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19901015\)60:8+<2075::AID-CNCR2820601521>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19901015)60:8+<2075::AID-CNCR2820601521>3.0.CO;2-F)
- Francis, I., Shrestha, J., Paudel, K. R., Hansbro, P. M., Warkiani, M. E., & Saha, S. C. (2022). Recent advances in lung-on-a-chip models. *Drug Discovery Today*, 27(9), 2593-2602. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.06.004>
- Francis, L. F. (2016). Melt processes. In *Materials processing: A unified approach to processing of metals, ceramics, and polymers* (pp. 105–249). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385132-1.00003-3>
- Freeman, F. E., Burdis, R., Mahon, O. R., Kelly, D. J., & Artzi, N. (2022). A spheroid model of early and late-stage osteosarcoma mimicking the divergent relationship between tumor elimination and bone regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 11(7), 2101296. <https://doi.org/10.1002/adhm.202101296>
- Freshney, R. I., Obradovic, B., Grayson, W., Cannizzaro, C., & Vunjak-Novakovic, G. (2007). Principles of tissue culture and bioreactor design. *Principles of tissue engineering*, 155-183. <https://doi.org/10.1016/B978-012370615-7/50016-0>
- Gamble, M., "The Hematoxylin and Eosin," in Bancroft, J. D., and Gamble, M. (Eds.), *Theory and Practice of Histological Techniques*, 6th ed. (Elsevier, 2008), pp. 121-134.
- Gamerith, G., Rainer, J., Amann, A., Koeck, S., Lorenz, E., Zwierzina, H., & Huber, J. M. (2015). Differences in RNA expression and chemosensitivity in 2D versus 3D non-small-cell lung cancer cultures. *Cancer Research*, 75(15_Supplement), 326-326. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-326>
- Gao, G., Kim, B. S., Jang, J., & Cho, D.-W. (2019). Recent strategies in extrusion-based three-dimensional cell printing toward organ biofabrication. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5(3), 1150–1169. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00691>
- Gasic, K., Hernandez, A., & Korban, S. S. (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 437-438. <https://doi.org/10.1007/BF02772687>
- Gaspar, D. A., Gomide, V., & Monteiro, F. J. (2012). The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter*, 2(4), 167-175. <https://doi.org/10.4161/biom.22170>

- Gebeyehu, A., Surapaneni, S. K., Huang, J., Mondal, A., Wang, V. Z., Haruna, N. F., Bagde, A., Arthur, P., Kutlehria, S., Patel, N., Rishi, A. K., & Singh, M. (2021). Polysaccharide hydrogel based 3D printed tumor models for chemotherapeutic drug screening. *Scientific Reports*, 11(1), 372. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79325-8>
- Gebhard, C., Gabriel, C., & Walter, I. (2016). Morphological and immunohistochemical characterization of canine osteosarcoma spheroid cell cultures. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 45(3), 219-230. <https://doi.org/10.1111/ahe.12190>
- Gerhardt, L. C., & Boccaccini, A. R. (2010). Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 3(7), 3867-3910. <https://doi.org/10.3390/ma3073867>
- Gleeson, J. P., Plunkett, N. A., & O'Brien, F. J. (2010). Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *Eur Cell Mater*, 20(218), 30. DOI: [10.22203/ecm.v020a18](https://doi.org/10.22203/ecm.v020a18)
- Godugu, C., Patel, A. R., Desai, U., Andey, T., Sams, A., & Singh, M. (2013). AlginateMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. *PloS one*, 8(1), e53708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053708>
- Gombotz, W. R., & Wee, S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 194-205. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.007>
- Gomes, A., Guillaume, L., Grimes, D. R., Fehrenbach, J., Lobjois, V., & Ducommun, B. (2016). Oxygen partial pressure is a rate-limiting parameter for cell proliferation in 3D spheroids grown in physioxenic culture condition. *PloS one*, 11(8), e0161239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161239>
- Gomez-Roman, N., Stevenson, K., Gilmour, L., Hamilton, G., & Chalmers, A. J. (2017). A novel 3D human glioblastoma cell culture system for modeling drug and radiation responses. *Neuro-oncology*, 19(2), 229-241. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now164>
- Gonçalves, C., Martins-Neves, S. R., Paiva-Oliveira, D., Oliveira, V. E., Fontes-Ribeiro, C., & Gomes, C. M. (2015). Sensitizing osteosarcoma stem cells to doxorubicin-induced apoptosis through retention of doxorubicin and modulation of apoptotic-related proteins. *Life sciences*, 130, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.03.009>
- Gong, X., Lin, C., Cheng, J., Su, J., Zhao, H., Liu, T., Wen, X., & Zhao, P. (2015). Generation of multicellular tumor spheroids with microwell-based agarose scaffolds for drug testing. *PloS one*, 10(6), e0130348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130348>
- González Díaz, E. C., Lee, A. G., Sayles, L. C., Feria, C., Sweet-Cordero, E. A., & Yang, F. (2022). A 3D osteosarcoma model with bone-mimicking cues reveals a critical role of bone mineral and informs drug Discovery. *Advanced healthcare materials*, 11(17), 2200768. <https://doi.org/10.1002/adhm.202200768>
- Gorgun, C., Ozturk, S., Gokalp, S., Vatansever, S., Gurhan, S. I. D., & Urkmez, A. S. (2016). Synergistic role of three dimensional niche and hypoxia on conservation of cancer stem cell phenotype. *International journal of biological macromolecules*, 90, 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.053>
- Grayson, W. L., Marolt, D., Bhumiratana, S., Fröhlich, M., Guo, X. E., & Vunjak-Novakovic, G. (2011). Optimizing the medium perfusion rate in bone tissue engineering bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 108(5), 1159-1170. <https://doi.org/10.1002/bit.23024> [Digital Object Identifier \(DOI\)](https://doi.org/10.1002/bit.23024)
- Grigore, A., Sarker, B., Fabry, B., Boccaccini, A. R., & Detsch, R. (2014). Behavior of encapsulated MG-63 cells in RGD and gelatine-modified alginate hydrogels. *Tissue Engineering Part A*, 20(15-16), 2140-2150. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0416>

- Grisez, B. T., Ray, J. J., Bostian, P. A., Markel, J. E., & Lindsey, B. A. (2018). Highly metastatic K7M2 cell line: a novel murine model capable of in vivo imaging via luciferase vector transfection. *Journal of Orthopaedic Research®*, 36(8), 2296-2304.
<https://doi.org/10.1002/jor.23868>
- Grobbs, B., De Deyn, P., & Slegers, H. (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell and tissue research*, 310(3), 257-270.
<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0651-7>
- Guan, X., & Huang, S. (2022). Advances in the application of 3D tumor models in precision oncology and drug screening. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 1021966.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1021966>
- Guller, A. E., Grebenyuk, P. N., Shekhter, A. B., Zvyagin, A. V., & Deyev, S. M. (2016). Bioreactor-based tumor tissue engineering. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 8(3 (30)), 44-58.
- Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York academy of sciences*, 1092(1), 385-396. <https://doi.org/10.1196/annals.1365.035>
- Han, H. J., Russo, J., Kohwi, Y., & Kohwi-Shigematsu, T. (2008). SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature*, 452(7184), 187-193.
<https://doi.org/10.1038/nature06781>
- Han, Y. H., Wang, Y., Lee, S. J., Jin, M. H., Sun, H. N., & Kwon, T. (2023). Regulation of anoikis by extrinsic death receptor pathways. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 227.
<https://doi.org/10.1186/s12964-023-01247-5>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Harley, B. A., Kim, H. D., Zaman, M. H., Yannas, I. V., Lauffenburger, D. A., & Gibson, L. J. (2008). Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. *Biophysical journal*, 95(8), 4013-4024.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.122598>
- Harrison, D. J., Geller, D. S., Gill, J. D., Lewis, V. O., & Gorlick, R. (2018). Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. *Expert review of anticancer therapy*, 18(1), 39-50.
<https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1413939>
- Hartung, T. (2009). Toxicology for the twenty-first century. *Nature*, 460(7252), 208-212.
<https://doi.org/10.1038/460208a>
- Haque, M. R., Wessel, C. R., Leary, D. D., et al. (2022). Patient-derived pancreatic cancer-on-a-chip recapitulates the tumor microenvironment. *Microsystems & Nanoengineering*, 8, 36.
<https://doi.org/10.1038/s41378-022-00370-6>
- Hay, I. D., Rehman, Z. U., Moradali, M. F., Wang, Y., & Rehm, B. H. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microbial biotechnology*, 6(6), 637-650.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12076>
- Hegyí, M., Semsei, A. F., Jakab, Z., Antal, I., Kiss, J., Szendroi, M., Csoka, M., & Kovacs, G. (2011). Good prognosis of localized osteosarcoma in young patients treated with limb-salvage

surgery and chemotherapy. *Pediatric blood & cancer*, 57(3), 415-422.

<https://doi.org/10.1002/pbc.23172>

Heinrich, F., Contioso, V. B., Stein, V. M., Carlson, R., Tipold, A., Ulrich, R., Puff, C., Baumgärtner, W., & Spitzbarth, I. (2015). Passage-dependent morphological and phenotypical changes of a canine histiocytic sarcoma cell line (DH82 cells). *Veterinary immunology and immunopathology*, 163(1-2), 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.006>

Ho, T. C., Chang, C. C., Chan, H. P., Chung, T. W., Shu, C. W., Chuang, K. P., Duh, T. H., Yang, M. H., & Tyan, Y. C. (2022). Hydrogels: properties and applications in biomedicine. *Molecules*, 27(9), 2902. <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>

Hong, X., Meng, Y., & Kalkanis, S. N. (2016). Serum proteins are extracted along with monolayer cells in plasticware and interfere with protein analysis. *Journal of biological methods*, 3(4), e51. <https://doi.org/10.14440/jbm.2016.129>

Hoshiba, T. (2019). Decellularized extracellular matrix for cancer research. *Materials*, 12(8), 1311. <https://doi.org/10.3390/ma12081311>

Hughes, C. S., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10(9), 1886-1890. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>

Hulst, A. C., Hens, H. J. H., Buitelaar, R. M., & Tramper, J. (1989). Determination of the effective diffusion coefficient of oxygen in gel materials in relation to gel concentration. *Biotechnology techniques*, 3, 199-204. <https://doi.org/10.1007/BF01875620>

Hunt, N. C., Smith, A. M., Gbureck, U., Shelton, R. M., & Grover, L. M. (2010). Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta biomaterialia*, 6(9), 3649-3656. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.026>

Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(10), 589-601. <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124>

Iwaki, Y. O., Escalona, M. H., Briones, J. R., & Pawlicka, A. (2012). Sodium alginate-based ionic conducting membranes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 554(1), 221-231. <https://doi.org/10.1080/15421406.2012.634329>

Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., ... & Mootha, V. K. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 336(6084), 1040-1044. <https://doi.org/10.1126/science.1218595>

Jaiswal, C., Dey, S., Prasad, J., Gupta, R., Agarwala, M., & Mandal, B. B. (2025). 3D bioprinted microfluidic based osteosarcoma-on-a chip model as a physiometric pre-clinical drug testing platform for anti-cancer drugs. *Biomaterials*, 320, 123267. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2025.123267>

Jang, J. Y., Kim, D., Im, E., & Kim, N. D. (2025). Etoposide as a key therapeutic agent in lung cancer: Mechanisms, efficacy, and emerging strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(2), 796. <https://doi.org/10.3390/ijms26020796>

Jeong, J., Kim, J. H., Shim, J. H., Hwang, N. S., & Heo, C. Y. (2019). Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials research*, 23(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>

Jiang, Y., & Uhrbom, L. (2012). On the origin of glioma. *Upsala journal of medical sciences*, 117(2), 113-121. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.658976>

- Jin, Q., Liu, G., Li, S., Yuan, H., Yun, Z., Zhang, W., Zhang, S., & Ma, Y. (2018). Decellularized breast matrix as bioactive microenvironment for in vitro three-dimensional cancer culture. *Journal of cellular physiology*, 234(4), 3425-3435. <https://doi.org/10.1002/jcp.26782>
- Jo, A., Denduluri, S., Zhang, B., Wang, Z., Yin, L., Yan, Z., Kang, R., Shi, L. L., Mok, J., Lee, M. J., & Haydon, R. C. (2014). The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes & diseases*, 1(2), 149-161. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.004>
- Johnson, A., Reimer, S., Childres, R., Cupp, G., Kohs, T. C. L., McCarty, O. J. T., & Kang, Y. A. (2022). The applications and challenges of the development of in vitro tumor microenvironment chips. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 16(1), 3–21. <https://doi.org/10.1007/s12195-022-00755-7>
- Jones, G. L., Walton, R., Czernuszka, J., Griffiths, S. L., El Haj, A. J., & Cartmell, S. H. (2010). Primary human osteoblast culture on 3D porous collagen-hydroxyapatite scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A*, 94(4), 1244-1250. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32805>
- Kanwar, J. R., Mahidhara, G., & Kanwar, R. K. (2012). Novel alginate-enclosed chitosan–calcium phosphate-loaded iron-saturated bovine lactoferrin nanocarriers for oral delivery in colon cancer therapy. *Nanomedicine*, 7(10), 1521-1550. <https://doi.org/10.2217/nmm.12.29>
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>
- Keeratchamroen, S., Sornprachum, T., Ngiwsara, L., Ornnork, N., & Svasti, J. (2023). p-STAT3 influences doxorubicin and etoposide resistance of A549 cells grown in an in vitro 3D culture model. *Oncology Reports*, 49(4), 71. <https://doi.org/10.3892/or.2023.8508>
- Khanna, C., Prehn, J., Yeung, C., Caylor, J., Tsokos, M., & Helman, L. (2000). An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clinical & experimental metastasis*, 18, 261-271. <https://doi.org/10.1023/A:1006767007547>
- Khosravizadeh, Z., Razavi, S., Bahramian, H., & Kazemi, M. (2014). The beneficial effect of encapsulated human adipose-derived stem cells in alginate hydrogel on neural differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102(4), 749-755. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33055>
- Kievit, F. M., Florczyk, S. J., Leung, M. C., Veisheh, O., Park, J. O., Disis, M. L., & Zhang, M. (2010). Chitosan–alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment. *Biomaterials*, 31(22), 5903-5910. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.062>
- Kim, J. W., Ho, W. J., & Wu, B. M. (2011). The role of the 3D environment in hypoxia-induced drug and apoptosis resistance. *Anticancer research*, 31(10), 3237-3245.
- Kim, Y., Meade, S. M., Chen, K., Feng, H., Rayyan, J., Hess-Dunning, A., & Ereifej, E. S. (2018). Nano-architectural approaches for improved intracortical interface technologies. *Frontiers in neuroscience*, 12, 456. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00456>
- Kim, S.Y., Khanna, C. (2014). Osteosarcoma. In: Schwab, M. (eds) Encyclopedia of Cancer. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27841-9_4289-2
- Komez, A., Buyuksungur, A., Antmen, E., Swieszkowski, W., Hasirci, N., & Hasirci, V. (2020). A two-compartment bone tumor model to investigate interactions between healthy and tumor cells. *Biomedical Materials*, 15(3), 035007. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab6b31>
- Kostic, D., Vidovic, S., & Obradovic, B. (2016). Silver release from nanocomposite Ag/alginate hydrogels in the presence of chloride ions: experimental results and mathematical modeling. *Journal of Nanoparticle Research*, 18, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3384-3>

- Kostić, D., Malagurski, I., & Obradović, B. (2017). Transport of silver nanoparticles from nanocomposite Ag/alginate hydrogels under conditions mimicking tissue implantation. *Hemijaska industrija*, 71(5), 383-394. <https://doi.org/10.2298/HEMIND160713049K>
- Kwak, T. K., Sohn, E. J., Kim, S., Won, G., Choi, J. U., Jeong, K., Jeong, M., Kwon, O. S., & Kim, S. H. (2014). Inhibitory effect of ethanol extract of *Ocimum sanctum* on osteopontin mediated metastasis of NCI-H460 non-small cell lung cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-419>
- Lam, B. P., Cheung, S. K., Lam, Y. W., & Pang, S. W. (2020). Microenvironmental topographic cues influence migration dynamics of nasopharyngeal carcinoma cells from tumour spheroids. *RSC advances*, 10(48), 28975-28983. <https://doi.org/10.1039/D0RA03740K>
- Lawlor, E. R., Scheel, C., Irving, J., & Sorensen, P. H. (2002). Anchorage-independent multicellular spheroids as an in vitro model of growth signaling in Ewing tumors. *Oncogene*, 21(2), 307-318. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205053>
- Lee, K. H., & Kim, T. H. (2021). Recent advances in multicellular tumor spheroid generation for drug screening. *Biosensors*, 11(11), 445. <https://doi.org/10.3390/bios11110445>
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- LeGeros, R. Z. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 395, 81-98.
- LeRoux, M. A., Guilak, F., & Setton, L. A. (1999). Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 47(1), 46-53. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199910\)47:1<46::AID-JBM6>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199910)47:1<46::AID-JBM6>3.0.CO;2-N)
- Leung, M., Kievit, F. M., Florczyk, S. J., Veis, O., Wu, J., Park, J. O., & Zhang, M. (2010). Chitosan-alginate scaffold culture system for hepatocellular carcinoma increases malignancy and drug resistance. *Pharmaceutical research*, 27(9), 1939-1948. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0198-3>
- Li, H. B., Jiang, H., Wang, C. Y., Duan, C. M., Ye, Y., Su, X. P., Kong, Q. X., Wu, J. F., & Guo, X. M. (2006). Comparison of two types of alginate microcapsules on stability and biocompatibility in vitro and in vivo. *Biomedical Materials*, 1(1), 42-47. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/1/1/007>
- Li, L., Chen, Y., Wang, Y., Shi, F., Nie, Y., Liu, T., & Song, K. (2019). Effects of concentration variation on the physical properties of alginate-based substrates and cell behavior in culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 184-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.123>
- Li, L. H., Kommareddy, K. P., Pilz, C., Zhou, C. R., Fratzl, P., & Manjubala, I. (2010). In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres. *Acta biomaterialia*, 6(7), 2525-2531. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.03.028>
- Li, X., Dai, J., Tang, Y., Li, L., & Jin, G. (2017). Quantitative proteomic profiling of tachyplesin I targets in U251 gliomaspheres. *Marine drugs*, 15(1), 20. <https://doi.org/10.3390/md15010020>
- Li, Y. Y., Choy, T. H., Ho, F. C., & Chan, P. B. (2015). Scaffold composition affects cytoskeleton organization, cell-matrix interaction and the cellular fate of human mesenchymal stem cells upon chondrogenic differentiation. *Biomaterials*, 52, 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.037>
- Li, Y., Yan, B., & He, S. (2023). Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 169, 115891. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115891>

- Li, Q., Lin, H., Rauch, J., Deleyrolle, L. P., Reynolds, B. A., Viljoen, H. J., Zhang, C., Gu, L., Van Wyk, E., Lei, Y., (2018). Scalable culturing of primary human glioblastoma tumor-initiating cells with a cell-friendly culture system. *Scientific Reports*, 8(1), 3531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21927-4>
- Li, W., Sun, X., Ji, B., Yang, X., Zhou, B., Lu, Z., & Gao, X. (2020). PLGA nanofiber/PDMS microporous composite membrane-sandwiched microchip for drug testing. *Micromachines*, 11(12), 1054. <https://doi.org/10.3390/mi11121054>
- Lin, F., de Gooijer, M. C., Hanekamp, D., Brandsma, D., Beijnen, J. H., & van Tellingen, O. (2013). Targeting core (mutated) pathways of high-grade gliomas: challenges of intrinsic resistance and drug efflux. *CNS oncology*, 2(3), 271-288. <https://doi.org/10.2217/cns.13.15>
- Lin, Y., Yang, Y., Yuan, K., Yang, S., Zhang, S., Li, H., & Tang, T. (2022). Multi-omics analysis based on 3D-bioprinted models innovates therapeutic target discovery of osteosarcoma. *Bioactive materials*, 18, 459-470. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.029>
- Liu, F. S. (2009). Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy—a quick review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 48(3), 239-244. [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(09\)60296-5](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60296-5)
- Liu, S., Li, H., Tang, B., Bi, S., & Li, L. (2016). Scaling law and microstructure of alginate hydrogel. *Carbohydrate polymers*, 135, 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.086>
- Liu, Z., & Vunjak-Novakovic, G. (2016). Modeling tumor microenvironments using custom-designed biomaterial scaffolds. *Current opinion in chemical engineering*, 11, 94-105. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2016.01.012>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopes, D., Martins-Cruz, C., Oliveira, M. B., & Mano, J. F. (2018). Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*, 185, 240-275. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.028>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-oncology*, 23(8), 1231-1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Luetke, A., Meyers, P. A., Lewis, I., & Juergens, H. (2014). Osteosarcoma treatment—where do we stand? A state of the art review. *Cancer treatment reviews*, 40(4), 523-532. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.006>
- Maji, S., & Lee, H. (2022). Engineering hydrogels for the development of three-dimensional in vitro models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2662. <https://doi.org/10.3390/ijms23052662>
- Mak, I. W., Evaniew, N., & Ghert, M. (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American journal of translational research*, 6(2), 114. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3902221>
- Mancha Sánchez, E., Gómez-Blanco, J. C., López Nieto, E., Casado, J. G., Macías-García, A., Díaz Díez, M. A., Carrasco-Amador, J. P., Torrejón Martín, D., Sánchez-Margallo, F. M., & Pagador, J. B. (2020). Hydrogels for bioprinting: A systematic review of hydrogels synthesis, bioprinting parameters, and bioprinted structures behavior. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 776. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00776>

- Martău, G. A., Mihai, M., & Vodnar, D. C. (2019). The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector—biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability. *Polymers*, 11(11), 1837. <https://doi.org/10.3390/polym11111837>
- Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., & Smidsrød, O. (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering*, 33(1), 79-89. <https://doi.org/10.1002/bit.260330111>
- Mei, Y., Wu, D., Berg, J., Tolksdorf, B., Roehrs, V., Kurreck, A., Hiller, T., & Kurreck, J. (2023). Generation of a perfusable 3D lung cancer model by digital light processing. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6071. <https://doi.org/10.3390/ijms24076071>
- Menshikh, K., Gobbo, V. A., Nascimben, M., Hannula, M., Cochis, A., Serra, T., Massera, J., Pandit, A., & Rimondini, L. (2025). 3D-printed β -TCP scaffold as a bone-mimicking environment for an engineered model of osteosarcoma: In vitro properties and transcriptomic insights. *Materials today Bio*, 32, 101766. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101766>
- Meyers, P. A., Schwartz, C. L., Krailo, M., Kleinerman, E. S., Betcher, D., Bernstein, M. L., Conrad, E., Ferguson, W., Gebhardt, M., Goorin, A. M., Harris, M. B., Healey, J., Huvos, A., Link, M., Montebello, J., Nadel, H., Nieder, M., Sato, J., Siegal, G., Weiner, M., Wells, R., Wold, L., Womer, R., Grier, H. (2005). Osteosarcoma: a randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *Journal of clinical oncology*, 23(9), 2004-2011. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.031>
- Minna, J. D., Roth, J. A., & Gazdar, A. F. (2002). Focus on lung cancer. *Cancer cell*, 1(1), 49-52.
- Mirabello, L., Troisi, R. J., & Savage, S. A. (2009). Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 115(7), 1531-1543. <https://doi.org/10.1002/cncr.24121>
- Mirzaali, M. J., Schwiedrzik, J. J., Thaiwichai, S., Best, J. P., Michler, J., Zysset, P. K., & Wolfram, U. (2016). Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly. *Bone*, 93, 196-211. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.018>
- Mitrović, D. D., Stojkowska, J., & Obradović, B. (2010). Controlled swelling and degradation studies of alginate microbeads in dilute sodium citrate solutions. *Hemijaska industrija*, 64(4), 253-263. <https://doi.org/10.2298/HEMIND100302038M>
- Modi, U., Kedaria, D., & Vasita, R. (2022). Differential migration and proliferation potential of the hydrogel aided 3D tumoroid. *Macromolecular bioscience*, 22(11), 2200196. <https://doi.org/10.1002/mabi.202200196>
- Mohseny, A. B., Hogendoorn, P. C., & Cleton-Jansen, A. M. (2012). Osteosarcoma models: from cell lines to zebrafish. *Sarcoma*, 2012(1), 417271. <https://doi.org/10.1155/2012/417271>
- Montecucco, A., & Biamonti, G. (2007). Cellular response to etoposide treatment. *Cancer letters*, 252(1), 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.11.005>
- Monteiro, C. F., Custódio, C. A., & Mano, J. F. (2019). Three-dimensional osteosarcoma models for advancing drug Discovery and development. *Advanced Therapeutics*, 2(3), 1800108. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800108>
- Monteiro, C. F., Custódio, C. A., & Mano, J. F. (2021). Bioengineering a humanized 3D tri-culture osteosarcoma model to assess tumor invasiveness and therapy response. *Acta Biomaterialia*, 134, 204-214. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.07.034>

- Mørch, Ý. A., Donati, I., Strand, B. L., & Skjåk-Bræk, G. (2006). Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads. *Biomacromolecules*, 7(5), 1471-1480. <https://doi.org/10.1021/bm060010d>
- Moscato, S., Ronca, F., Campani, D., & Danti, S. (2015). Poly (vinyl alcohol)/gelatin hydrogels cultured with HepG2 cells as a 3D model of hepatocellular carcinoma: a morphological study. *Journal of functional biomaterials*, 6(1), 16-32. <https://doi.org/10.3390/jfb6010016>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mota, C., Camarero-Espinosa, S., Baker, M. B., Wieringa, P., & Moroni, L. (2020). Bioprinting: from tissue and organ development to in vitro models. *Chemical reviews*, 120(19), 10547-10607. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00789>
- El Motassime, A., Vitiello, R., Comodo, R. M., Capece, G., Bocchino, G., Bocchi, M. B., Maccauro, G., & Meschini, C. (2025). Osteosarcoma: A Comprehensive Morphological and Molecular Review with Prognostic Implications. *Biology*, 14(10), 1407. <https://doi.org/10.3390/biology14101407>
- Munoz-Garcia, J., Jubelin, C., Loussouarn, A., Goumard, M., Griscom, L., Renodon-Cornière, A., Heymann, M.-F., & Heymann, D. (2021). In vitro three-dimensional cell cultures for bone sarcomas. *Journal of Bone Oncology*, 30, 100379. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2021.100379>
- Munson, J. M., Bellamkonda, R. V., & Swartz, M. A. (2013). Interstitial flow in a 3D microenvironment increases glioma invasion by a CXCR4-dependent mechanism. *Cancer research*, 73(5), 1536-1546. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2838>
- Muraro, M. G., Muenst, S., Mele, V., Quagliata, L., Iezzi, G., Tzankov, A., Weber, W. P., Spagnoli, G. C., & Soysal, S. D. (2017). Ex-vivo assessment of drug response on breast cancer primary tissue with preserved microenvironments. *Oncoimmunology*, 6(7), e1331798. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1331798>
- Nagle, P. W., Plukker, J. T. M., Muijs, C. T., van Luijk, P., & Coppes, R. P. (2018, December). Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 53, pp. 258-264). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.06.005>
- Nakada, M., Nakada, S., Demuth, T., Tran, N. L., Hoelzinger, D. B., & Berens, M. E. (2007). Molecular targets of glioma invasion. *Cellular and molecular life sciences*, 64(4), 458. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6342-5>
- Nero, C., Vizzielli, G., Lorusso, D., Cesari, E., Daniele, G., Loverro, M., Scambia, G., & Sette, C. (2021). Patient-derived organoids and high grade serous ovarian cancer: from disease modeling to personalized medicine. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01917-7>
- Ngo, H., Amartumur, S., Tran, V. T. A., Tran, M., Diep, Y. N., Cho, H., & Lee, L. P. (2023). In vitro tumor models on chip and integrated microphysiological analysis platform (MAP) for life sciences and high-throughput drug screening. *Biosensors*, 13(2), 231. <https://doi.org/10.3390/bios13020231>
- Nguyen, T. V., Sleiman, M., Moriarty, T., Herrick, W. G., & Peyton, S. R. (2014). Sorafenib resistance and JNK signaling in carcinoma during extracellular matrix stiffening. *Biomaterials*, 35(22), 5749-5759. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.058>
- Ning, L., Malmström, H., & Ren, Y. F. (2015). Porous collagen-hydroxyapatite scaffolds with mesenchymal stem cells for bone regeneration. *Journal of Oral Implantology*, 41(1), 45-49. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-12-00298>
- Niu, G., Yousefi, B., Qujeq, D., Marjani, A., Asadi, J., Wang, Z., & Mir, S. M. (2021). Melatonin and doxorubicin co-delivered via a functionalized graphene-dendrimeric system enhances apoptosis

of osteosarcoma cells. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111554.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111554>

Di Nunno, V., Franceschi, E., Tosoni, A., Gatto, L., Bartolini, S., & Brandes, A. A. (2022). Tumor-associated microenvironment of adult gliomas: a review. *Frontiers in Oncology*, 12, 891543. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891543>

Nusterer, M., Rauch, J., & Viljoen, H. (2022). Theoretical and experimental investigation of alginate microtube extrusion for cell culture applications. *Biochemical engineering journal*, 177, 108236. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108236>

Olderøy, M. Ø., Lilledahl, M. B., Beckwith, M. S., Melvik, J. E., Reinholt, F., Sikorski, P., & Brinchmann, J. E. (2014). Biochemical and structural characterization of neocartilage formed by mesenchymal stem cells in alginate hydrogels. *PloS one*, 9(3), e91662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091662>

Ostrom, Q. T., Bauchet, L., Davis, F. G., Deltour, I., Fisher, J. L., Langer, C. E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J. A., Turner, M. C., Walsh, K. M., Wrensch, M. R., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-oncology*, 16(7), 896-913. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou087>

Ottaviani, G., & Jaffe, N. (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Pediatric and adolescent osteosarcoma*, 3-13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_1

Ozturk, M. S., Lee, V. K., Zou, H., Friedel, R. H., Intes, X., & Dai, G. (2020). High-resolution tomographic analysis of in vitro 3D glioblastoma tumor model under long-term drug treatment. *Science advances*, 6(10), eaay7513. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay7513>

Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10), 839-845. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>

Panda, M., Tripathi, S. K., & Biswal, B. K. (2021). SOX9: An emerging driving factor from cancer progression to drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1875(2), 188517. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188517>

Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33(11), 3279-3305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>

Pedron, S., Becka, E., & Harley, B. A. (2013). Regulation of glioma cell phenotype in 3D matrices by hyaluronic acid. *Biomaterials*, 34(30), 7408-7417. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.024>

Pellegrini, E., Desando, G., Petretta, M., Cellamare, A., Cristalli, C., Pasello, M., Manara, M. C., Grigolo, B., & Scotlandi, K. (2022). A 3D collagen-based bioprinted model to study osteosarcoma invasiveness and drug response. *Polymers*, 14(19), 4070. <https://doi.org/10.3390/polym14194070>

Pereira, M. S., Cardoso, L. M. D. F., Silva, T. B., Teixeira, A. J., Mizrahi, S. E., Ferreira, G. S. M., Dantas, F. M. L., Cotta-de-Almeida, V., & Alves, L. A. (2020). A Low-Cost Open Source Device for Cell Microencapsulation. *Materials*, 13(22), 5090. <https://doi.org/10.3390/ma13225090>

Piccirillo, M. C., Daniele, G., Di Maio, M., Bryce, J., De Feo, G., Del Giudice, A., Perrone, F., & Morabito, A. (2010). Vinorelbine for non-small cell lung cancer. *Expert opinion on drug safety*, 9(3), 493-510. <https://doi.org/10.1517/14740331003774078>

Pîslaru, A. I., Albișteanu, S. M., Ilie, A. C., Ștefaniu, R., Mârza, A., Moscaliuc, Ș., Nicoară, M., Turcu, A. M., Grigoraș, G., & Alexa, I. D. (2024). Lung cancer: new directions in senior patients assessment. *Geriatrics*, 9(4), 101. <https://doi.org/10.3390/geriatrics9040101>

- Place, T. L., Domann, F. E., & Case, A. J. (2017). Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 311-322. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003>
- Plopper, C. G. (1996). Structure and function of the lung. In *Respiratory system* (pp. 135-150). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61042-4_13
- Pradhan, S., Clary, J. M., Seliktar, D., & Lipke, E. A. (2017). A three-dimensional spheroidal cancer model based on PEG-fibrinogen hydrogel microspheres. *Biomaterials*, 115, 141-154. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.052>
- Prosecka, E., Rampichova, M., Vojtová, L., Tvrdik, D., Melčáková, Š., Juhasova, J., Plencner, M., Jakubová, R., Jančář, J., Nečas, A., Kochová, P., Klepáček, J., Tonar, Z., & Amler, E. (2011). Optimized conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 99(2), 307-315. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33189>
- Qin, Y. (2008). Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer international*, 57(2), 171-180. <https://doi.org/10.1002/pi.2296>
- Quartieri, M. (2023). *Developing a Protocol for In Vitro Characterization of Circulating Cancer Stem Cell-like Cells* (doktorska disertacija). <https://doi.org/10.26083/tuprints-00026346>
- Ressler, A., Žužić, A., Ivanišević, I., Kamboj, N., & Ivanković, H. (2021). Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review. *Open Ceramics*, 6, 100122. <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2021.100122>
- Rimann, M., Laternser, S., Gvozdenovic, A., Muff, R., Fuchs, B., Kelm, J. M., & Graf-Hausner, U. (2014). An in vitro osteosarcoma 3D microtissue model for drug development. *Journal of biotechnology*, 189, 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.005>
- Ritter, J., & Bielack, S. S. (2010). Osteosarcoma. *Annals of oncology*, 21, vii320-vii325. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq276>
- Romani, A. M. (2022). Cisplatin in cancer treatment. *Biochemical pharmacology*, 206, 115323. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115323>
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental technique.
- Sahoo, D. R., & Biswal, T. (2021). Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences*, 3(1), 30. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04096-w>
- Samavedi, S., Whittington, A. R., & Goldstein, A. S. (2013). Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior. *Acta biomaterialia*, 9(9), 8037-8045. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>
- Sánchez, P., Hernández, R. M., Pedraz, J. L., & Orive, G. (2013). Encapsulation of cells in alginate gels. In *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition* (pp. 313-325). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_21
- Schneider, T., Mawrin, C., Scherlach, C., Skalej, M., & Firsching, R. (2010). Gliomas in adults. *Deutsches Ärzteblatt International*, 107(45), 799. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2010.0799>
- Shen, Y., Li, X., Dong, D., Zhang, B., Xue, Y., & Shang, P. (2018). Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *American journal of cancer research*, 8(6), 916.
- Shi, H., Zhou, Z., Li, W., Fan, Y., Li, Z., & Wei, J. (2021). Hydroxyapatite based materials for bone tissue engineering: A brief and comprehensive introduction. *Crystals*, 11(2), 149. <https://doi.org/10.3390/cryst11020149>

- Shie, M. Y., Fang, H. Y., Kan, K. W., Ho, C. C., Tu, C. Y., Lee, P. C., Hsueh, P. R., Chen, C. H., Lee, A. K. X., Tien, N., Chen, J. X., Shen, Y. C., Chang, J. G., Shen, Y. F., Lin, T. J., Wang, B., Hung, M. C., Cho, D. Y., & Chen, Y. W. (2023). Highly mimetic ex vivo lung-cancer spheroid-based physiological model for clinical precision therapeutics. *Advanced Science*, 10(16), 2206603. <https://doi.org/10.1002/advs.202206603>
- da Silva, B., Mathew, R. K., Polson, E. S., Williams, J., & Wurdak, H. (2018). Spontaneous glioblastoma spheroid infiltration of early-stage cerebral organoids models brain tumor invasion. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, 23(8), 862-868. <https://doi.org/10.1177/2472555218764623>
- Skardal, A., Devarasetty, M., Forsythe, S., Atala, A., & Soker, S. (2016). A reductionist metastasis-on-a-chip platform for in vitro tumor progression modeling and drug screening. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(9), 2020–2032. <https://doi.org/10.1002/bit.25950>
- Smeland, S., Bielack, S. S., Whelan, J., Bernstein, M., Hogendoorn, P., Krailo, M. D., Gorlick, R., Janeway, K. A., Ingleby, F. C., Anninga, J., Antal, I., Arndt, C., Brown, K. L. B., Butterfass-Bahloul, T., Calaminus, G., Capra, M., Dhooze, C., Eriksson, M., Flanagan, A. M., Friedel, G., Gebhardt, M. C., Gelderblom, H., Goldsby, R., Grier, H. E., Grimer, R., Hawkins, D. S., Hecker-Nolting, S., Hall, K. S., Isakoff, M. S., Jovic, G., Kühne, T., Kager, L., von Kalle, T., Kabickova, E., Lang, S., Lau, C. C., Leavey, P. J., Lessnick, S. L., Mascarenhas, L., Mayer-Steinacker, R., Meyers, P. A., Nagarajan, R., Randall, R. L., Reichardt, P., Renard, M., Reznitz, C., Schwartz, C. L., Strauss, S., Teot, L., Timmermann, B., Sydes, M. R., & Marina, N. (2019). Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. *European journal of cancer*, 109, 36-50. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.027>
- Smidsrød, O., & Skja, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in biotechnology*, 8, 71-78. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O)
- Sminia, P., & Mayer, R. (2012). External beam radiotherapy of recurrent glioma: radiation tolerance of the human brain. *Cancers*, 4(2), 379-399. <https://doi.org/10.3390/cancers4020379>
- Soles, A., Selimovic, A., Sbrocco, K., Ghannoum, F., Hamel, K., Moncada, E. L., ... & Cvetanovic, M. (2023). Extracellular matrix regulation in physiology and in brain disease. *International journal of molecular sciences*, 24(8), 7049. <https://doi.org/10.3390/ijms24087049>
- Sonzini, G., Granados-Aparici, S., Sanegre, S., Diaz-Lagares, A., Diaz-Martin, J., de Andrea, C., Eritja, N., Bao-Caamano, A., Costa-Fraga, N., García-Ros, D., Salguero-Aranda, C., Davidson, B., López-López, R., Melero, I., Navarro, S., Ramon y Cajal, S., de Alava, E., Matias-Guiu, X., & Noguera, R. (2022). Integrating digital pathology with transcriptomic and epigenomic tools for predicting metastatic uterine tumor aggressiveness. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1052098. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1052098>
- Soubéran, A., & Tchoghandjian, A. (2020). Practical review on preclinical human 3D glioblastoma models: advances and challenges for clinical translation. *Cancers*, 12(9), 2347. <https://doi.org/10.3390/cancers12092347>
- Stewart, D. J., Chiritescu, G., Dahrouge, S., Banerjee, S., & Tomiak, E. M. (2007). Chemotherapy dose–response relationships in non-small cell lung cancer and implied resistance mechanisms. *Cancer treatment reviews*, 33(2), 101-137. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.12.002>
- Stojkovska, J. J. (2015). *Dobijanje i karakterisanje nanokompozitnih hidrogelova na bazi alginata i nanočestica srebra za primenu u biomedicini* (Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet).
- Stojkovska, J., Petrovic, P., Jancic, I., Milenkovic, M. T., & Obradovic, B. (2019). Novel nano-composite hydrogels with honey effective against multi-resistant clinical strains of *Acinetobacter*

- baumannii and Pseudomonas aeruginosa. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 8529-8543. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10055-2>
- Stojkowska, J., Zvicer, J., Milivojević, M., Petrović, I., Stevanović, M., & Obradović, B. (2020). Validation of a novel perfusion bioreactor system in cancer research. *Hemijska industrija*, 74(3), 187-196. <https://doi.org/10.2298/HEMIND200329015S>
- Stuckler, D., Singhal, J., Singhal, S. S., Yadav, S., Awasthi, Y. C., & Awasthi, S. (2005). RLIP76 Transports Vinorelbine and Mediates Drug Resistance in Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer research*, 65(3), 991-998. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.991.65.3>
- Sun, D., Gao, W., Hu, H., & Zhou, S. (2022). Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(7), 3049-3062. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>
- Sun, L., Wang, X., He, Y., Chen, B., Shan, B., Yang, J., Wang, R., Zeng, X., Li, J., Tan, H., & Liang, R. (2023). Polyurethane scaffold-based 3D lung cancer model recapitulates in vivo tumor biological behavior for nanoparticulate drug screening. *Regenerative Biomaterials*, 10, rbad091. <https://doi.org/10.1093/rb/rbad091>
- Sung, H. J., Meredith, C., Johnson, C., & Galis, Z. S. (2004). The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*, 25(26), 5735-5742. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.066>
- Sung, J. H., & Shuler, M. L. (2009). A micro cell culture analog (μ CCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Lab on a Chip*, 9(10), 1385-1394. <https://doi.org/10.1039/B901377F>
- Suo, A., Xu, W., Wang, Y., Sun, T., Ji, L., & Qian, J. (2019). Dual-degradable and injectable hyaluronic acid hydrogel mimicking extracellular matrix for 3D culture of breast cancer MCF-7 cells. *Carbohydrate polymers*, 211, 336-348. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.115>
- Svanström, A., Rosendahl, J., Salerno, S., Leiva, M. C., Gregersson, P., Berglin, M., Bogestål, Y., Lausmaa, J., Oko, A., Chinga-Carrasco, G., Petronis, S., Standoft, S., Ståhlberg, A., Joakim Håkansson, J., Landberg, G. (2021). Optimized alginate-based 3D printed scaffolds as a model of patient derived breast cancer microenvironments in drug discovery. *Biomedical Materials*, 16(4), 045046. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac0451>
- Tabriz, A. G., Hermida, M. A., Leslie, N. R., & Shu, W. (2015). Three-dimensional bioprinting of complex cell laden alginate hydrogel structures. *Biofabrication*, 7(4), 045012. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/4/045012>
- Taelman, J., Diaz, M., & Guiu, J. (2022). Human intestinal organoids: promise and challenge. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 854740. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.854740>
- Tallawi, M., Rosellini, E., Barbani, N., Cascone, M. G., Rai, R., Saint-Pierre, G., & Boccaccini, A. R. (2015). Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(108). <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0254>
- Tang, Y., Huang, B., Dong, Y., Wang, W., Zheng, X., Zhou, W., Zhang, K., & Du, Z. (2017). Three-dimensional prostate tumor model based on a hyaluronic acid-alginate hydrogel for evaluation of anti-cancer drug efficacy. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 28(14), 1603-1616. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1338502>
- Taymaz-Nikerel, H., Karabekmez, M. E., Eraslan, S., & Kırdar, B. (2018). Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. *Scientific Reports*, 8(1), 13672. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31939-9>

- Tornín, J., Villasante, A., Solé-Martí, X., Ginebra, M. P., & Canal, C. (2021). Osteosarcoma tissue-engineered model challenges oxidative stress therapy revealing promoted cancer stem cell properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 164, 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.437>
- Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., & Tannock, I. F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1441-1454. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm135>
- Tsai, H.-F., Trubelja, A., Shen, A. Q., & Bao, G. (2017). Tumour-on-a-chip: Microfluidic models of tumour morphology, growth and microenvironment. *Journal of the Royal Society Interface*, 14(127), 20170137. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0137>
- Tudor, G. S. J., & Thomas, S. J. (2004). Equivalent diameters of elliptical fields. *The British Journal of Radiology*, 77(923), 941-943. <https://doi.org/10.1259/bjr/65139264>
- Ulrich, T. A., Jain, A., Tanner, K., MacKay, J. L., & Kumar, S. (2010). Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen-agarose matrices. *Biomaterials*, 31(7), 1875-1884. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.047>
- Veleirinho, B., Berti, F. V., Dias, P. F., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R. M., & Lopes-da-Silva, J. A. (2013). Manipulation of chemical composition and architecture of non-biodegradable poly (ethylene terephthalate)/chitosan fibrous scaffolds and their effects on L929 cell behavior. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1), 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.07.047>
- Vella, N., Fenech, A. G., & Petroni Magri, V. (2024). 3D cell culture models in research: applications to lung cancer pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1438067. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1438067>
- Vesel, M., Rapp, J., Feller, D., Kiss, E., Jaromi, L., Meggyes, M., Miskei, G., Duga, B., Smuk, G., Laszlo, T., Karner, I., & Pongracz, J. E. (2017). ABCB1 and ABCG2 drug transporters are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling. *Respiratory research*, 18(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0537-6>
- Vunjak-Novakovic, G., & Radisic, M. (2004). Cell seeding of polymer scaffolds. *Biopolymer methods in tissue engineering*, 131-145. <https://doi.org/10.1385/1-59259-428-X:131>
- Wagner, B. A., Venkataraman, S., & Buettner, G. R. (2011). The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(3), 700-712. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.024>
- Wally, J., & Buchanan, S. K. (2007). A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *Biomaterials*, 20, 249-262. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9062-7>
- Wang, M. L., Xu, N. Y., Tang, R. Z., & Liu, X. Q. (2022). A 3D-printed scaffold-based osteosarcoma model allows to investigate tumor phenotypes and pathogenesis in an in vitro bone-mimicking niche. *Materials today Bio*, 15, 100295. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100295>
- Wang, Q., Li, S., Xie, Y., Yu, W., Xiong, Y., Ma, X., & Yuan, Q. (2006). Cytoskeletal reorganization and repolarization of hepatocarcinoma cells in APA microcapsule to mimic native tumor characteristics. *Hepatology research*, 35(2), 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2006.03.003>
- Wang, X., Li, X., Dai, X., Zhang, X., Zhang, J., Xu, T., & Lan, Q. (2018a). Coaxial extrusion bioprinted shell-core hydrogel microfibers mimic glioma microenvironment and enhance the drug resistance of cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.042>
- Wang, X., Zhang, X., Dai, X., Wang, X., Li, X., Diao, J., & Xu, T. (2018b). Tumor-like lung cancer model based on 3D bioprinting. *3 Biotech*, 8, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1519-1>

- Wei, B., Zhou, X., Liang, C., Zheng, X., Lei, P., Fang, J., Han, X., Wang, L., Qi, C., & Wei, H. (2017). Human colorectal cancer progression correlates with LOX-induced ECM stiffening. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1450. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21230>
- Weiswald, L. B., Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*, 17(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>
- Wieleba, I., Wojas-Krawczyk, K., Krawczyk, P., & Milanowski, J. (2022). Clinical application perspectives of lung cancers 3D tumor microenvironment models for in vitro cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2261. <https://doi.org/10.3390/ijms23042261>
- Wistuba, I. I., & Gazdar, A. F. (2006). Lung cancer preneoplasia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1, 331–348. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100103>
- Wen, Q., & Chklovskii, D. B. (2005). Segregation of the brain into gray and white matter: a design minimizing conduction delays. *PLoS computational biology*, 1(7), e78. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010078>
- Wu, Y., Zhou, Y., Qin, X., & Liu, Y. (2021). From cell spheroids to vascularized cancer organoids: Microfluidic tumor-on-a-chip models for preclinical drug evaluations. *Biomicrofluidics*, 15(6). <https://doi.org/10.1063/5.0062697>
- Xie, Y., Kollampally, S. C. R., Jorgensen, M., & Zhang, X. (2022). Alginate microfibers as therapeutic delivery scaffolds and tissue mimics. *Experimental biology and medicine*, 247(23), 2103-2118. <https://doi.org/10.1177/15353702221112905>
- Xu, F., Celli, J., Rizvi, I., Moon, S., Hasan, T., & Demirci, U. (2011). A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. *Biotechnology journal*, 6(2), 204-212. <https://doi.org/10.1002/biot.201000340>
- Xu, H., Lyu, X., Yi, M., Zhao, W., Song, Y., & Wu, K. (2018). Organoid technology and applications in cancer research. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0662-9>
- Yang, X., Lu, Z., Wu, H., Li, W., Zheng, L., & Zhao, J. (2018). Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 83, 195-201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.09.002>
- Yi, H. G., Jeong, Y. H., Kim, Y., Choi, Y. J., Moon, H. E., Park, S. H., Kang, K. S., Bae, M., Jang, J., Youn, H., Paek, S. H., & Cho, D. W. (2019). A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. *Nature Biomedical Engineering*, 3(7), 509–519. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0363-x>
- Zadro, R., Pokrić, B., & Pučar, Z. (1981). Dependence of diffusion coefficients and immunoprecipitating titers on pH: Human serum transferrin, immunoglobulin A, human chorionic somatomammotropin, and their rabbit antibodies. *Analytical biochemistry*, 117(1), 238-244. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90717-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90717-X)
- Zhang, X., Chen, X., Hong, H., Hu, R., Liu, J., & Liu, C. (2022). Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioactive materials*, 10, 15-31. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.014>
- Zhao, F., Yin, Y., Lu, W. W., Leong, J. C., Zhang, W., Zhang, J., Zhang, M. & Yao, K. (2002). Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials*, 23(15), 3227-3234. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00077-7)

- Zhao, Y., Yao, R., Ouyang, L., Ding, H., Zhang, T., Zhang, K., Cheng, S., & Sun, W. (2014). Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro. *Biofabrication*, 6(3), 035001. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035001>
- Zhu, L., Zhang, J., Guo, Q., Kuang, J., Li, D., Wu, M., Mo, Y., Zhang, T., Gao, X., & Tan, J. (2023). Advanced lung organoids and lung-on-a-chip for cancer research and drug evaluation: a review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11, 1299033. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1299033>
- Zhu H, Tang J, Tang M, Cai H. Upregulation of SOX9 in osteosarcoma and its association with tumor progression and patients' prognosis. *Diagn Pathol*. 2013;8:183. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-183>
- Ziółkowska-Suchanek, I. (2021). Mimicking tumor hypoxia in non-small cell lung cancer employing three-dimensional in vitro models. *Cells*, 10(1), 141. <https://doi.org/10.3390/cells10010141>
- <https://water.lsbu.ac.uk/water/alginate.html> 14.1.2025. 12:23
- World Health Organization. (2024, February 1). *Global cancer burden growing, amidst mounting need for services*. <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>
- <https://www.careerpower.in/school/biology/lungs> 14.4.2026. 17:44

BIOGRAFIJA

Jelena Petrović rođena je 7.6.1993. u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Osnovne i master studije pohađala je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu od 2012. do 2017. godine, sa prosečnom ocenom 9,22 na osnovnim i 9,63 na master studijama. Doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2017. godine na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo, pod rukovodstvom prof. Bojane Obradović i dr Jasmine Stojkovske. Položila je sve ispite predviđene studijskim programom i završni ispit pod nazivom „Teorijsko i eksperimentalno istraživanje 3D sistema za gajenje kancer ćelija baziranih na mikrovlaknima polimernih hidrogelova“, sa prosečnom ocenom 10,00.

Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja četiri godine studiranja i dobitnik nagrade Tehnološko-metalurškog fakulteta „Panta S. Tutundžić“. Od 2018. godine zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, najpre kao istraživač-pripravnik, a od 2021. godine kao istraživač-saradnik. Učestvovala je u dva projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, na projektu *Bioengineered Tumor* (br. 7503) Fonda za nauku Republike Srbije, kao i u dve COST akcije. Naučno usavršavanje ostvarila je u Srbiji, Nemačkoj, Italiji i Švajcarskoj.

Tokom doktorskih studija učestvovala je u izvođenju vežbi na Katedri za hemijsko inženjerstvo. Autor je 6 radova u međunarodnim časopisima i više od 40 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima. Dobitnik je nagrade za najbolju brzu prezentaciju na konferenciji *Innovative Biomaterials for Novel Medical Devices 2024* i nagrade za najbolju usmenu prezentaciju na konferenciji *YUCOMAT 2024*.

Govori engleski, španski, italijanski i nemački jezik.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Јелена Петровић

Број индекса: 4003/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биомимични 3Д систем за гајење малигних ћелија и поуздано испитивање антитуморских лекова“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 6.7.2026.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Јелена Петровић

Број индекса 4003/2017

Студијски програм Хемијско инжењерство

Наслов рада „Биомимични 3Д систем за гајење малигних ћелија и поуздано испитивање антитуморских лекова“

Ментори др Бојана Обрадовић, редовни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет, и др Јасмина Стојковска, виши научни сарадник Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 6.7.2026.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Биомимични 3Д систем за гајење малигних ћелија и поуздано испитивање антитуморских лекова“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 6.7.2026.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.