



**TURUN
YLIOPISTO**

3D-soluviljely syöpätutkimuksessa

Katsaus erilaisista 3D-soluviljelymalleista

LuK-tutkielma

Turun Yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemia

02/2024

Verneril Lonka

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

Vernerilönka: 3D-soluviljely syöpätutkimuksessa: Katsaus erilaisista 3D-soluviljelymalleista
Tutkielma, 20 s.

Biokemia

Helmikuu 2024

Ohjaaja: Dosentti Elina Siljamäki

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin Originality Check -järjestelmällä

Syöpä on yleisnimitys sairauksista, joissa solujen liiallista jakautumista estävät kasvurajoitegeenit mutatoituvat ja menettävät toimintakykynsä. Tämän seurauksena soluissa muodostuneet onkogeneetit saavat yliotteen ja solut alkavat jakautua rajoittamattomasti muodostaen pahalaatuisen kasvaimen eli syöpäkasvaimen.

Syöpätutkimusta on suoritettu pääasiassa perinteisillä tasomaisilla soluviljelyillä, mutta tutkimusolosuhteista johtuen, saadut tulokset eivät aina ole luotettavia. Eläinkokeita käytetään syöpätutkimuksessa erityisesti syöpälääkkeiden terapeuttisten tehokkuuksien tutkimiseen, mutta eläinkokeet ovat kuitenkin aikaa vieviä ja kalliita, minkä lisäksi niiden eettisyyttä on alettu kyseenalaistamaan.

Erilaiset 3D-soluviljelymallit ovat nousseet korvaamaan tasomaista soluviljelyä sekä kaventamaan soluviljelymallien eroja verrattaessa eläinkokeisiin. 3D-soluviljelymalleilla voidaan kasvattaa yksinkertaisempia, syöpäkasvaimia jäljitteleviä, kolmiulotteisia rakenteita eli sferoideja tai monimutkaisempia, elimiä jäljitteleviä organoideja. 3D-soluviljelymallit voidaan jakaa kahteen joukkoon niiden kasvatuksellisten erojen perusteella.

Vapaasti kasvavissa 3D-soluviljelymalleissa solut kasvavat elatusaineessa itsenäisesti kasautuen kolmiulotteisiksi rakenteiksi, kun taas rakenteellisesti tuetuissa 3D-soluviljelymalleissa solut kasvavat ja muodostavat kolmiulotteisen rakenteen tuetusti soluväliainetta jäljittelevissä rakenteissa.

Sisältö

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Johdanto | 2 |
| 2 | 3D-soluviljely syöpätutkimuksessa..... | 3 |
| 2.1 | 3D-soluviljelyn sferoidit ja organoidit..... | 3 |
| 2.2 | Erot verrattuna tasomaiseen soluviljelyyn | 4 |
| 2.3 | 2D- vs. 3D-soluviljelymallit lääkekehityksessä | 8 |
| 3 | Vapaana kasvavat 3D-soluviljelymallit | 9 |
| 3.1 | Riippuva pisara | 10 |
| 3.2 | Matalakiinnitteinen levy | 10 |
| 3.3 | Magneettinen levitaatio ja magneettinen 3D-biotulostus..... | 11 |
| 4 | Rakenteellisesti tuetut 3D-soluviljelymallit..... | 12 |
| 4.1 | Matriisiin päällinen ja matriisiin sulautettu 3D-soluviljely | 13 |
| 4.2 | 3D-biotulostus | 14 |
| 4.3 | Mikrofluidinen alusta | 15 |
| 4.4 | Mikrokuvioitu levy | 16 |
| 5 | Yhteenveto | 17 |
| | Lähteet | 18 |

1 Johdanto

Syövät ovat yksi yleisimmistä kuolinsyistä maailmanlaajuisesti. Vuoden 2020 globaalin arvion mukaan syövät todettiin kuolinsyiksi miltei kymmenessä miljoonassa tapauksessa ja uusia syöpätapauksia todettiin likimäärin 19,3 miljoonaa (Sung ja muut 2021).

Syövän synty eli karsinogeneesi on mutkikas vaiheittainen tapahtuma, jossa solussa tapahtuvien geenimutaatioiden takia muodostuu syöpägenejä eli onkogenejä. Kasvurajoitegeenit voivat menettää toimintakykynsä esimerkiksi geneettisen mutaation tai kromosomimutaation takia. Tämän seurauksena onkogeneit saavat syöpäsolun jakaantumaan hallitsemattomasti, jolloin muodostuu syöpäkasvain. Kasvaimesta voi irrota syöpäsoluja verenkiertoon ja imunesteeseen. Nämä syöpäsolut kulkeutuvat verenkierron ja imusolmukkeiden kautta muualle elimistöön, jolloin ne voivat muodostaa metastaaseja eli etäpesäkkeitä. Yli 90 % syöpäkuolemista johtuu etäpesäkkeistä. (Peitzsch ja muut 2017.)

Syöpäsolujen käyttäytymistä ja rakennetta voidaan tutkia solukasvatusten avulla *in vitro*. Yleisimmin syöpätutkimuksessa käytetty menetelmä on tasomainen soluviljely (ns. 2D-soluviljely), mutta sillä on heikkouksia, joiden seurauksena on kehitelty erilaisia kolmiulotteisia soluviljelymalleja (Kapałczyńska ja muut 2018). 3D-soluviljelymalleilla on huomattavia etuja tasomaiseen 2D-soluviljelyyn nähden. 3D-soluviljelymallit mahdollistavat syöpäkasvaimelle *in vivo* ominaisuuksia ja näiden ominaisuuksien ansiosta lääkeaineiden, kemoterapian sekä sädehoidon vaikutuksia syöpäkasvaimiin voidaan paremmin arvioida *in vitro*. (Nath ja Devi 2016; Perche ja Torchilin 2012.)

2 3D-soluviljely syöpätutkimuksessa

Perinteisessä 2D-soluviljelyssä *in vitro* solut kasvavat tasossa, mikä ei vastaa solujen todellista rakennetta. Tämä johtaa siihen, että 2D-soluviljelyissä kasvaimissa tapahtuvat biokemialliset ja biologiset prosessit, sekä lääkeainevasteet eivät todenmukaisesti vastaa *in vivo* syöpäkasvaimissa tapahtuvia biokemiallisia ja biologisia prosesseja tai vasteita. Tähän tarpeeseen vastaavat erilaiset 3D-soluviljelymallit, jotka kolmiulotteisten rakenteidensa ansiosta mallintavat paremmin *in vivo* syöpäkasvainten rakenteita, minkä ansiosta tutkimuksissa saadut tulokset ovat luotettavampia. (Salinas-Vera ja muut 2022.)

2.1 3D-soluviljelyn sferoidit ja organoidit

3D-soluviljelymalleissa muodostuneita kasvatuksia sanotaan sferoideiksi tai organoideiksi. Joskus sferoideista ja organoideista puhutaan virheellisesti samana asiana, vaikka niiden välillä on selviä eroja (**Taulukko 1**). Sferoidit ovat yksinkertaisia syöpäsoluista muodostuneita monisoluisia kolmiulotteisia rakenteita, joita kasvatetaan elatusaineessa ilman soluväliainetta. Fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet ajavat soluja yhteen luoden kolmiulotteisen rakenteen. Organoidit puolestaan ovat sferoideja monimutkaisempia kolmiulotteisia rakenteita, jotka koostuvat kantasoluista tai indusoiduista kantasoluista (ns. pluripotentista kantasoluista). Organoidien muodostumista ohjaa kantasolujen kyky uudistua ja erilaistua erilaisiksi solutyypeiksi, jotka yhdessä muodostavat pienen ”elimen” eli organoidin ja mallintavat elimen monimuotoisuutta. Organoidit vaativat kasvaakseen soluväliaineen. (El Harane ja muut 2023.)

Soluväliaine, toiselta nimeltään solunulkoinen matriisi, on soluton komponentti, jota on kaikissa kudoksissa ja elimissä. Soluväliaine koostuu pääosin rakenneproteiineista, integriineistä, kasvutekijöistä ja tyvikalvosta. Erilaisia rakenneproteiineja ovat kollageenit, elastiinit, fibronectiinit, laminiinit ja tenaskiinit. Soluväliaineessa olevia kasvutekijöitä ovat esimerkiksi verisuonten endoteeli- ja fibroblastikasvutekijät sekä transformoiva kasvutekijä β , mutta jokaisen kudoksen soluväliaine on koostumukseltaan erilainen. Tyvikalvo on soluväliaineessa oleva kerros, joka kiinnittää epiteelisoluja niiden alla oleviin sidekudoksiin. Soluväliaine toimii ulkoisena tukirakenteena soluille sekä on kemiallisten ja fysikaalisten ärsykkeiden avulla osallisena solujen jakautumisessa, vaelluksessa ja erikoistumisessa. (Frantz ja muut 2010; Kular ja muut 2014.)

Taulukko 1. Sferoidien ja organoidien väliset keskeiset eroavaisuudet (El Harane ja muut 2023; Gunti ja muut 2021).

| | Sferoidit | Organoidit |
|---------------|--|--|
| Solukoostumus | - Syöpäsolulinjat, primäärisolut, kasvainsolut tai kudokset | - Aikuisten tai alkion kantasolut, pluripotenti kantasolut, kasvainsolut tai kudokset |
| Muodostuminen | - Solut kasautuvat itsenäisesti tai avustetusti | - Solut kasautuvat ja organisoituvat fysikaalisten ja kemiallisten ärsykkeiden vaikutuksesta |
| Rakenne | - Yhtä tai useampaa solutyyppiä sisältävä heterogeeninen rakenne, jossa solut ovat jakautuvia, lepotilassa tai nekroottisia | - Monimutkainen useita solutyyppiä sisältävä heterogeeninen rakenne, joka mallintaa osittain elimen monimuotoisuutta |
| Soluväliaine | - Voi kasvaa soluväliaineen läsnäollessa tai ilman | - Vaatii soluväliaineen aiheuttamia vasteita muodostuakseen |
| Viljely | - Vapaasti kasvavilla 3D-soluviljelymalleilla tai rakenteellisesti tuetuilla 3D-soluviljelymalleilla - Pitkäaikainen viljely ei ole mahdollista | - Vain rakenteellisesti tuetuilla 3D-soluviljelymalleilla, sillä tarvitsee soluväliaineen - Pitkäaikainen viljely mahdollista |

2.2 Erot verrattuna tasomaiseen soluviljelyyn

2D-soluviljelymalleihin verrattuna 3D-soluviljelymalleilla on paljon erilaisia ominaisuuksia, joiden ansiosta niitä käytetään enenevässä määrin syöpätutkimuksessa (**Taulukko 2**) (Jensen ja Teng 2020).

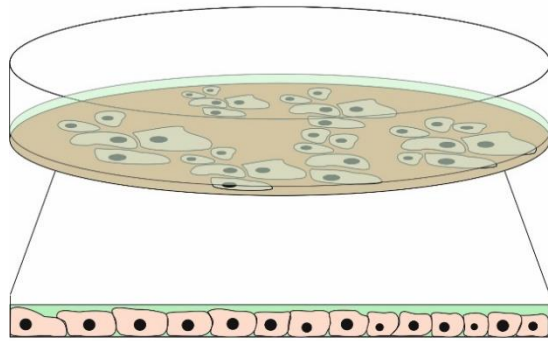
2D-soluviljelyssä kasvainsolut kasvavat kiinteässä tasomaisessa kasvualustassa, joka on yleensä muovia. Lisäksi solut ovat yhdessä kerroksessa, minkä seurauksena koko solukasvusto on jatkuvassa kosketuksessa elatusaineeseen, jolloin ravinteita ja happea on saatavilla käytännössä loputtomasti (**Kuva 1A**). Tällaisissa olosuhteissa solut jakaantuvat epärealistisen nopealla tahdilla, mikä ei vastaa todellisuutta. 3D-soluviljelymalleissa kasvainsolut säilyttävät isäntäsolulle *in vivo* tyypillisen rakenteen ja jäljittelevät sitä. Sferoidien sisään jäävät solut eivät saa ravinteita ja happea yhtä paljoa kuin pintasolut, minkä vuoksi kasvustoon muodostuu gradientteja. Tämä johtaa solujen lisääntymiseen

niissä kasvaimen osissa, joissa ravinteita on saatavilla, ja ne osat, jotka jäävät ilman, menevät hypoksiaan tai apoptoituvat. Sferoidit ovat siis heterogeenisiä eli ne sisältävät nekroottisista soluista koostuvan ytimen, jota ympäröi lepotilassa olevat solut ja aivan pinnalla on jakautuvia soluja (**Kuva 1B**). (Antoni ja muut 2015; Kapalczyńska ja muut 2018.)

3D-soluviljelymallien kolmiulotteinen rakenne mahdollistaa solujen välisen sekä solujen ja soluväliaineen välisten vuorovaikutusten synnyn *in vitro*. Kasvainsolukot siis käyttäytyvät kuin syöpäsolu *in vivo*, eli ne ovat polarisoituneita ja niiden fysiologiset geno- ja fenotyypit ovat todenmukaisempia kuin 2D-solumalleilla. Ne kykenevät erilaistumaan, muodostamaan verisuonistoa, reagoimaan ärsykkeisiin, ilmentämään geenejä, syntetisoimaan proteiineja, välttämään immuunijärjestelmää, tunkeutumaan viereisiin kudoksiin ja osallistumaan lääkeaineenvaihduntaan. (Antoni ja muut 2015.)

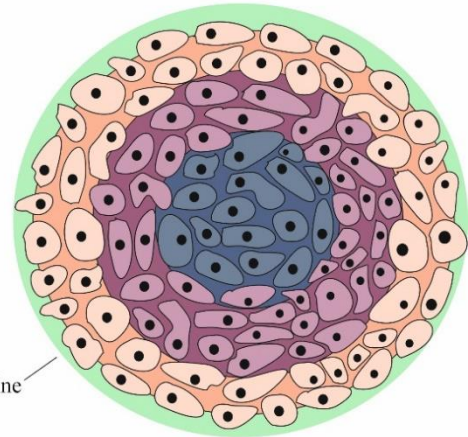
Syöpäsolujen kasvattaminen 3D-soluviljely-ympäristössä mahdollistaa solukon vapaan leviämisen ja kasautumisen kolmiulotteiseen rakenteeseen sekä polarisaation, jotka ovat kyseiselle syöpäkasvaimelle tyypillistä *in vivo*. 3D-rakenne lisää solujen välisiä sekä solujen ja soluväliaineen välisiä vuorovaikutuksia. Tämä tarkoittaa sitä, että solut ovat kosketuksissa joko toisten kasvaimen solujen tai soluväliaineen kanssa, mikä johtaa kasvaimen mikroympäristön muodostumiseen (Antoni ja muut 2015.) Syöpäkasvaimen mikroympäristö on tärkeä kasvaimen tutkimisen kannalta, sillä se tarjoaa tutkittavaksi sellaisia tunnusomaisia piirteitä, joita syöpäkasvaimilla on *in vivo*. Näitä piirteitä ovat kasvukinetiikka, signaalintireittiaktiivisuudet, geenien ilmentyminen, rajallinen ravinteiden ja hapen saanti, hypoksia eli hapenpuute, verisuonistot sekä solukon heterogeenisyys. Lisäksi kasvainsoluja voidaan kasvattaa yhteiskasvatuksessa stroomasolujen kanssa, jolloin voidaan havainnoida stroomavälitteisiä vaikutuksia. (Salinas-Vera ja muut 2022; Xin ja muut 2019.)

A) 2D-soluviljelmä



Kaikki solut ovat jakautuvia ja samassa solusyklin vaiheessa

B) 3D-soluviljelmä



Jakautuvat solut Lepotilassa olevat solut

Pintakerros Välikerros Nekroottinen ydin

Kuva 1. Luonnosmainen esitys 2D- ja 3D-soluviljelyiden rakenteellisista eroista. **A) Perinteinen 2D-soluviljely**, jossa solut kasvavat kiinteässä muovisessa alustassa yhdessä kerroksessa. Kaikki solut ovat yhteydessä elatusaineeseen eli soluilla on rajattomasti happea ja ravinteita. Solukko on homogeeninen, ja tässä tapauksessa solut ovat myös jakautuvia. **B) 3D-soluviljelyssä** solut muodostavat kolmiulotteisia rakenteita joihin muodostuu happi- ja ravintoainegradientteja, joiden takia solukosta tulee heterogeeninen eli se sisältää jakautuvia ja lepotilassa olevia soluja sekä nekroottisen ytimen, joka koostuu kuolleista soluista. (Salinas-Vera ja muut 2022; Van Zundert ja muut 2020.) Kuva muokattu lähteistä (Salinas-Vera ja muut 2022; Van Zundert ja muut 2020).

Taulukko 2. 2D- ja 3D-soluviljelyjen eroavaisuuksia (Habanjar ja muut 2021; Jensen ja Teng 2020; Kapałczyńska ja muut 2018).

| Soluviljelytyyppi | 2D | 3D |
|----------------------------------|---|--|
| Kustannukset | <ul style="list-style-type: none"> - Halpa ylläpitää - Saatavilla paljon kaupallisia testejä | <ul style="list-style-type: none"> - Aikaa vievää ja kallista - Kaupallisia kokeita vähän - Vähentää tarvetta eläinkokeille |
| Ravinteiden saanti | <ul style="list-style-type: none"> - Rajaton saatavuus ravinteita, aineenvaihduntatuotteita, signaalimolekyylejä ja happea - Solusykli vaihe useassa solussa sama | <ul style="list-style-type: none"> - Ravintoaine- ja happigradientteja - Sisimmät solut lepotilassa ravinteiden ja hapenpuutteen vuoksi, mikä mallintaa kasvaimen sisimpien solujen toimintaa <i>in vivo</i> |
| Solujen elinkelpoisuus | <ul style="list-style-type: none"> - Alttiita sytotoksiineille | <ul style="list-style-type: none"> - Vastustuskykyisempi ulkoisille tekijöille |
| Solun rakenne | <ul style="list-style-type: none"> - Muuttunut muoto ja jakautuminen, solut litteitä ja venyneitä - Solut yhdessä kerroksessa - Fenotyyppi ja polarisaatio muuttunut | <ul style="list-style-type: none"> - Solut säilyttävät alkuperäisen muotonsa ja jakautumisen - Muodostuu 3D-kasaumia ja sferoideja, joilla on useita kerroksia - Polarisoitunut ja laaja fenotyyppi |
| Solujakautuminen | <ul style="list-style-type: none"> - Solut jakautuvat epäluonnollisella vauhdilla | <ul style="list-style-type: none"> - Solut jakautuvat realistisesti - Jakautumisnopeus riippuu tekniikasta ja tutkittavista soluista |
| Soluliitokset | <ul style="list-style-type: none"> - Vähäisiä | <ul style="list-style-type: none"> - Yleisiä |
| Solujen erilaistuminen | <ul style="list-style-type: none"> - Erilaistuminen on heikkoa | <ul style="list-style-type: none"> - Erilaistuminen on tehokasta |
| Solujen väliset vuorovaikutukset | <ul style="list-style-type: none"> - Köyhtyneet solu-solu-vuorovaikutukset ja solunulkoiset vuorovaikutukset - Mikroympäristö puuttuu | <ul style="list-style-type: none"> - Täydet solu-solu- ja solu-solunulkoiset vuorovaikutukset - <i>In vivo</i> kaltainen mikroympäristö |
| Molekulaariset mekanismit | <ul style="list-style-type: none"> - Geeni- ja proteiini-ekspressiotasot muuttuneet verrattuna <i>in vivo</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Geeni- ja proteiini-ekspressiotasot vastaavat tasoja <i>in vivo</i> |
| Lääkeherkkyys | <ul style="list-style-type: none"> - Solut yliherkkiä lääkille - Huono lääkeaineenvaihdunta | <ul style="list-style-type: none"> - Solut vastustuskykyisempiä - Parempi lääkeaineenvaihdunta - Lääkkeiden vaikutukset todenmukaisempia |

2.3 2D- vs. 3D-soluviljelymallit lääkekehityksessä

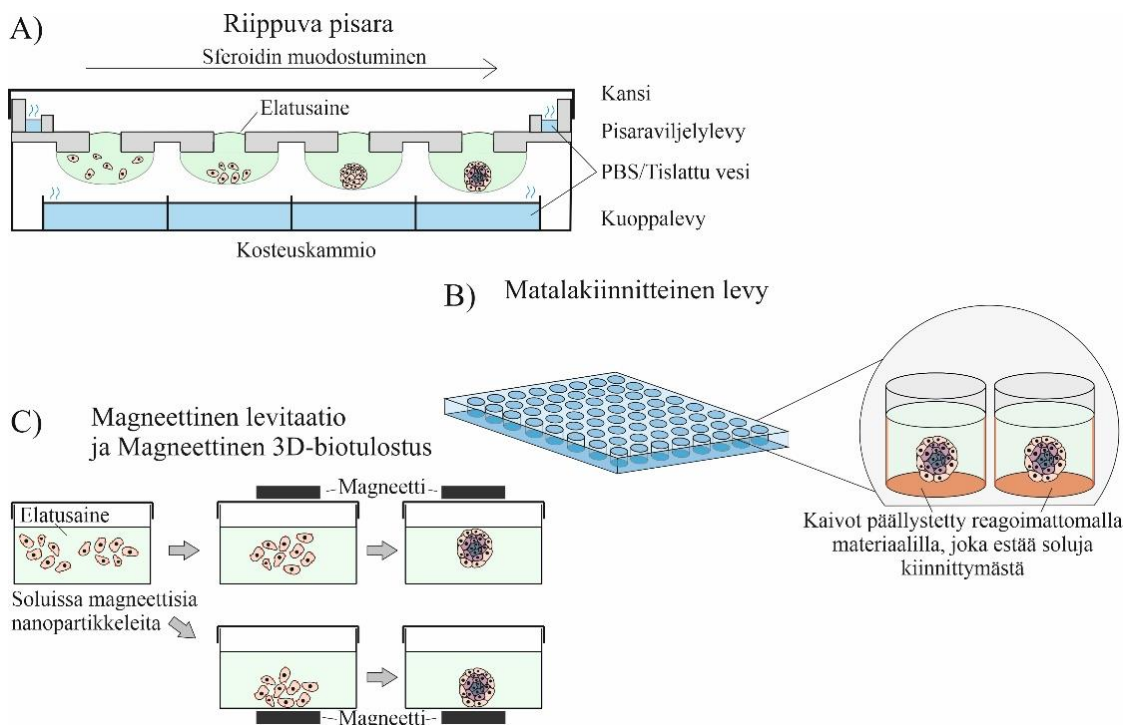
Vaikka 2D-soluviljelymallit ovat olleet tärkeitä syöpätutkimuksessa syövän mekanismien ymmärtämisessä, ne eivät ole osoittautuneet tehokkaiksi malleiksi lääketutkimuksessa ja eläinkokeet, joilla tätä ongelmaa on paikattu, ovat kalliita, aikaa vieviä sekä eettisesti ongelmallisia (Antoni ja muut 2015; Costa ja muut 2016). Kolmannes uusista lääkkeistä hylätään ja yli puolet kaikista kliinisten tutkimusten vaiheissa II ja III olevista lääkkeistä osoittautuu tehottomiksi (Harrison 2016). Suurten hylkäysmäärien ja korkeiden kustannusten vuoksi uusia ja tarkempia menetelmiä on välttämätöntä kehittää. (Langhans 2018). Lääketutkimuksissa käytetään aineenvaihdunnallista profilointia todentamaan eri solujen välistä aineenvaihdunnallista yhteistyötä. 3D-soluviljelymallien on todettu antavan lääkkeiden tehokkuuksista tarkempaa tietoa. (Jensen ja Teng 2020.)

3D-soluviljelymallien on todettu olevan vastustuskykyisempiä erilaisia kasvurajoitelääkkeitä, sekä kemo- ja immunoterapiaa että sädehoitoa kohtaan (Costa ja muut 2016). Kasvurajoiteläkkeiden kohdalla tämä johtuu siitä, että 2D-soluviljelymalleissa solukko on homogeeninen, toisin kuin 3D-soluviljelymalleissa, joissa solukko on heterogeeninen. Kasvurajoiteläkkeet vaikuttavat laajentumisvaiheessa oleviin soluihin, joita on 3D-solumalleissa vähemmän, sillä kasvaimen solut ovat eri solusyklin vaiheissa. 3D-soluviljelymalleilla on myös happigradientin aiheuttamia lepotilassa olevia soluja sekä nekroottinen ydin, jotka ovat vastustuskykyisempiä kemo- ja immunoterapiaa, sekä sädehoitoa kohtaan. (Langhans 2018.) 2D-soluviljelymallit siis antavat väärän kuvan lääkkeiden ja hoitojen tehokkuuksista homogeenisten rakenteidensa takia.

Lääketutkimus pohjautuu käsitykseen solujen ja soluväliaineen välisestä vuorovaikutuksesta. Soluväliaineen koostumus voi lisätä solujen vastustuskykyä lääkettä kohtaan tai voimistaa lääkeaineen vaikutusta. Soluväliaineen sisältämät molekyylit vaikuttavat merkittävästi solujen jakaantumiseen, erikoistumiseen ja selviytymiseen. (Breslin ja O'Driscoll 2013; Jensen ja Teng 2020.) Solujen välisten sekä solujen ja soluväliaineen välisten vuorovaikutusten ymmärtämisen tarpeeseen vastaavat 3D-soluviljelymallit, jotka kykenevät mallintamaan *in vivo* kasvaimen mikroympäristöä ja täten antamaan todenmukaisemman arvion lääkkeiden vaikutuksista syöpäkasvaimeen (Lv ja muut 2017).

3 Vapaana kasvavat 3D-soluviljelymallit

Vapaana kasvavat 3D-soluviljelymallit (engl. *anchorage independent 3D cell culture models*) perustuvat solujen luontaiseen kykyyn ryhmittäytyä itsenäisesti solukoiksi muodostaen sferoideja ilman ulkopuolisia tekijöitä. Monisoluiset kasvainsferoidit ovat yksi suosituimmista tämän hetken 3D-soluviljelymalleista. Sferoideja voidaan muodostaa yksittäisistä lisääntyvistä soluista tai jo valmiiksi kasautuneista soluista, jotka lisääntyvät edelleen (Van Zundert ja muut 2020). Muodostuneet sferoidit voivat erittää itselleen ajan kanssa soluväliaineen, jolloin kehittyä luonnollisia solu-soluväliaine -vuorovaikutuksia. Sferoidien kokoon vaikuttaa kasvatukseen lisättyjen solujen määrä ja sferoideihin muodostuu kokonsa ansiosta ravinto- ja happigradiennteja. Vapaana kasvavien 3D-soluviljelymallien sferoidit ovat yleisesti löyhästi kasautuneet, ja niiden sisältämät fibronectiinit ovat levittäytyneet tasaisesti koko sferoidiin. (Barbosa ja muut 2022; Langhans 2018; Nath ja Devi 2016.) Vapaana kasvavia 3D-soluviljelymalleja ovat riippuva pisara (engl. *hanging drop method*), matalakiinnitteinen levy (engl. *low attachment plates*), magneettisesti leijuva (engl. *magnetic levitation*) ja magneettinen 3D-biotulostus (engl. *magnetic 3D-bioprinting*) (**Kuva 2**) (Langhans 2018).



Kuva 2. Vapaana kasvavat 3D-soluviljelymallit. **A) Riippuva pisara** -soluviljelyssä solut muodostavat sferoideja painovoiman vaikutuksesta. **B) Matalakiinnitteinen levy** -soluviljelyssä kaivot on pinnoitettu inertillä materiaalilla, joka kannustaa soluja kasautumaan sferoidiksi. **C) Magneettisessa levitaatiossa ja magneettisessa 3D-biotulostuksessa** käytetään magneettisia soluja ja magneetin vaikutusta sferoidien muodostamiseen. (Nath ja Devi 2016.) Kuva muokattu lähteestä (Nath ja Devi 2016).

3.1 Riippuva pisara

Riippuva pisara 3D-soluviljelymalli hyödyntää pintajännitystä ja painovoimaa sferoidien muodostamiseen. Kasvatus aloitetaan lisäämällä petrimaljan kanteen pieni määrä elatusainetta, noin 15–30 µl, johon haluttuja soluja on suspensoitu. Pisanan pintajännitys on suurempi kuin sen paino ja pitää sen kiinni petrimaljan kannessa, kun kansi käännetään ympäri ja laitetaan petrimaljan päälle. Petrimaljaan laitetaan hieman tislattua vettä tai fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS), mikä estää solususpensiopisaroita kuivumasta. Nykyään on myös varta vasten pizarasoluviljelylle kehitettyjä soluviljelylevyjä, joissa on levy pisaroille sekä osastot nesteelle (**Kuva 2A**). Riippuvassa pizarasoluviljelyssä solut painuvat painovoiman vaikutuksesta pisanan pohjalle ja kasautuvat siellä muodostaen sferoidin. Monisoluisia sferoideja voidaan valmistaa yhteissolususpensiolla tai soluja jälkikäteen lisäämällä, jolloin muodostuu erilaisia solukerroksia. (Langhans 2018; Nath ja Devi 2016; Velasco ja muut 2020.)

Riippuvaa pizarasoluviljelyä on käytetty esimerkiksi maksa-, rinta-, munasarja- ja eturauhassyöpäkasvaimen mekanismien tutkimiseen (Jubelin ja muut 2022; Pinto ja muut 2020). Riippuvan pizarasoluviljelyn etuna on sen yksinkertaisuus, sillä menetelmä ei vaadi soluväliainetta, ja sen kyky tuottaa pienestä solumäärästä paljon sferoideja, joiden kokoa ja rakennetta on helppo kontrolloida. Tämän menetelmän huonoina puolina pidetään solususpension haihtumista ja siitä johtuvaa osmolaalisuuden kasvua sekä yhdisteiden, esimerkiksi lääkeaineiden, lisäämisen tai elatusaineen vaihdon vaikeutta. Edellä mainitut toimenpiteet ovat haastavia, sillä sferoidi on silloin altis fyysiselle vahingolle. Jos pizaraviljelyllä tuotettuja sferoideja halutaan kasvattaa pitkään tai tehdä niille tutkimuksellisia toimenpiteitä, pitää sferoidi siirtää suuremmalle alustalle. (Jubelin ja muut 2022; Lv ja muut 2017; Nath ja Devi 2016; Pinto ja muut 2020; Velasco ja muut 2020.)

3.2 Matalakiinnitteinen levy

Matalakiinnitteinen levy -soluviljelyssä viljelyalustan kaivot on päällystetty reagoimattomalla aineella kuten poly-2-hydroksietyylimetakrylaatilla. Kun viljelykseen lisätään solususpensiota, kaivojen pinnoite estää soluja kiinnittymästä ja kannustavat niitä kasautumaan sferoidiksi (**Kuva 2B**). Jotkin solutyypit eivät aina kasaudu itse sferoideiksi, minkä vuoksi lisätoimenpiteet, kuten hellävarainen sentrifugointi on tarpeen. (Nath ja Devi 2016; Salinas-Vera ja muut 2022; Velasco ja muut 2020.)

Suuren tilavuutensa ansiosta matalakiinnitteiset levyt soveltuvat yhteisviljelyyn monisolujen sferoidien valmistamiseksi sekä pidempiaikaiseen viljelyyn. Lisäksi tutkimukselliset toimenpiteet voidaan suorittaa alkuperäisessä kaivossa. Matalakiinnitteisillä levyillä on viljelty ja tutkittu esimerkiksi keuhko-, rinta-, aivo- ja maksasolusyöpälinjoja sekä pään ja kaulan alueen okasolusyöpälinjoja (El Harane ja muut 2023; Pinto ja muut 2020). Matalakiinnitteisten levyjen etuna pidetään menetelmän yksinkertaisuutta ja matalia kustannuksia. Sferoideja voidaan tuottaa suuressa mittakaavassa ilman soluväliainetta, siten että yhdessä kaivossa on yksi sferoidi, mikä helpottaa tutkimuksia. Jotkin solulinjat eivät kuitenkaan muodosta tiivistä sferoidia, mitä pidetään matalakiinnitteisten levyjen huonona puolena. (Langhans 2018; Nath ja Devi 2016; Pinto ja muut 2020; Velasco ja muut 2020.)

3.3 Magneettinen levitaatio ja magneettinen 3D-biotulostus

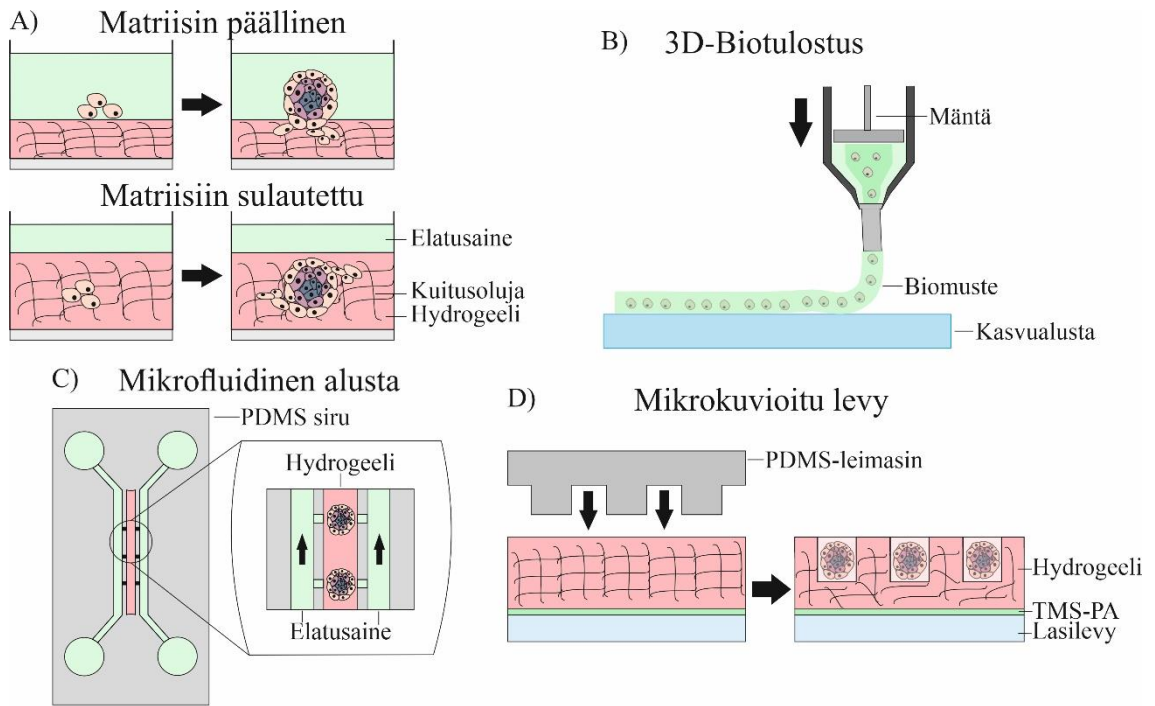
Magneettinen levitaatio ja magneettinen 3D-biotulostus käyttävät apunaan magneetteja sferoidien muodostamisessa. Viljeltäviä, toisissaan kiinni olevia, kasvainsoluja inkuboidaan magneettisten rautaoksidinanopartikkelien kanssa, jolloin kasvainsolut ottavat ne sisäänsä ja magnetisoituvat. Magnetisoituneet solut trypsinoidaan, jotta ne irtoavat toisistaan, minkä jälkeen ne siirretään alhaisen tarttuvuuden kasvatusalustalle. Siirron jälkeen magneetti tuodaan joko kasvatusalustan päälle, jolloin kyseessä on magneettinen levitaatio tai kasvatusalustan alle, jolloin kyseessä on magneettinen 3D-biotulostus. Magneettiset kasvainsolut kasautuvat magneetin vaikutuksesta lähelle elatusaineen pintaa (magneettinen levitaatio) tai kasvatusalustan pohjaan (magneettinen 3D-biotulostus) ja muodostavat sferoidin (**Kuva 2C**). (Velasco ja muut 2020.)

Näitä menetelmiä on käytetty esimerkiksi rinta-, keuhko-, aivo- ja haimasyövän tutkimiseen. (Pinto ja muut 2020; Velasco ja muut 2020). Magneettisen levitaation ja magneettisen 3D-biotulostuksen etuna pidetään heterotyyppisten sferoidien helppoa ja nopeaa muodostumista, sferoidit voivat muodostua jopa alle 16 tunnissa. Lisäksi magneettia voidaan käyttää mallintamaan verenkiertoa tai vaikuttamaan sferoidin sijaintiin viljelmässä. Haittoina pidetään nanopartikkelien tarvetta sekä niiden hintaa. Kaikki nanopartikkelit eivät myöskään sovi jokaiselle solulinjalle ja suurina määrinä voivat olla myrkyllisiä tutkittaville soluille sekä muuttaa niiden toimintoja. (El Harane ja muut 2023; Langhans 2018; Nath ja Devi 2016; Velasco ja muut 2020.)

4 Rakenteellisesti tuetut 3D-soluviljelymallit

Rakenteellisesti tuetuissa 3D-soluviljelymalleissa (engl. *anchorage dependent cell culture models*) solut kasvavat soluväliainetta jäljittelevissä ja kudoksia muistuttavissa huokoisissa silloitetuissa rakenteissa, joita kutsutaan hydrogeeleiksi. Hydrogeelit tarjoavat soluille tukea ja mahdollistavat liuenneiden aineiden kulkeutumisen sekä edesauttavat solujen ja soluväliaineen välisten vuorovaikutusten syntymistä. (Habanjar ja muut 2021; Nath ja Devi 2016; Tomás-Bort ja muut 2020.)

Hydrogeelit voivat olla joko luonnollisia tai synteettisesti valmistettuja mallintamaan tiettyjä soluväliaineen ominaisuuksia. Luonnolliset hydrogeelit pohjautuvat kollageenimatriisiin ja hyaluronihappopolymeerimatriisiin tai Matrigel:iin. Matrigel on hiiren sarkoomasoluista saatua kaupalliseen tarkoitukseen valmistettua luonnollista soluväliainetta, joka sisältää tyvikalvoproteiineja, sytokiineja ja erilaisia kasvutekijöitä. Synteettisinä hydrogeeleinä käytetään polyglykolihoa, polyetyleeniglykolia ja polymaitohappoa. Luonnolliset hydrogeelit ovat enemmän aidon soluväliaineen kaltaisia verrattuna synteettisiin, mutta esimerkiksi Matrigel:ssä voi olla eräkohtaisia eroavaisuuksia sen tuotantotavasta johtuen. Synteettisten hydrogeelien etuna on niiden koostumuksen ja ominaisuuksien hallinta. Soluväliaineet vaihtelevat koostumukseltaan ja niiden ominaisuudet riippuvat käytettävästä solusta. Rakenteellisesti tuettuja 3D-soluviljelymalleja ovat matriisin päällinen (engl. *matrix on top*), matriisiin sulautettu (engl. *matrix embedded*), 3D-biotulostus (engl. *3D-bioprinting*), mikrofluidinen alusta (engl. *microfluidic platform*) ja mikrokuvioitu levy (engl. *micropatterned plates*) (**Kuva 3**). Rakenteellisesti tuetuilla 3D-soluviljelymalleilla voidaan soluväliaineen ansioista kasvattaa sferoidien lisäksi myös organoideja. (Habanjar ja muut 2021; Nath ja Devi 2016; Pinto ja muut 2020; Van Zundert ja muut 2020.)



Kuva 3. Rakenteellisesti tuetut 3D-soluviljelymallit. **A) Matrisin päällisessä** soluviljelyssä solut istutetaan soluväliaineen ja elatusaineen rajapintaan ja **matriisiin sulautetussa** soluviljelyssä solut istutetaan soluväliaineeseen. **B) 3D-biotulostuksessa** soluja, hydrogeeliä ja kasvutekijöitä sisältävää biomustetta tulostetaan kerroksittain kasvualustalle, jolloin muodostuu kolmiulotteisia rakenteita. **C) Mikrofluidinen alusta** -soluviljelyssä soluja kasvatetaan polydimetyylisiloksaanista (engl. *polydimethylsiloxane*, PDMS) valmistetuissa siruissa, joiden kanavissa ne ovat upotettuna matriisiin. Sirujen kanavissa on myös elatusainevirtausta, jolla mallinnetaan verisuonistoa. **D) Mikrokuviointu levy** -soluviljelyssä soluja kasvatetaan hydrogeelimatriisiin PDMS-leimasimella painetuissa kaivoissa. Hydrogeelimatriisi on kiinnitetty lasilevyyn 3-trimetoksisilyylipolymetakrylaati (engl. *3-trimethoxysilyl polymethacrylate*, TMS-PA) kerroksella. (Pinto ja muut 2020; Zhang ja muut 2021.) Kuvaa muokattu lähteistä (Pinto ja muut 2020; Zhang ja muut 2021).

4.1 Matrisin päällinen ja matriisiin sulautettu 3D-soluviljely

Matriisin päällinen ja matriisiin sulautettu 3D-soluviljelymalli ovat käytännössä sama menetelmä erilaisella toteutuksella. Molemmissa menetelmissä viljelyalustat esikäsitellään matriisilla, jonka annetaan jähmettyä. Matriisin päällisessä soluviljelyssä solut istutetaan matriisin ja elatusaineen rajapintaan, johon solut tarttuvat ja kasautuvat. Matriisiin sulautetussa soluviljelyssä haluttuja soluja suspensoidaan nestemäiseen matriisiin ja solumatriisisuspensio pipetoidaan esikäsiteltyyn viljelyalustaan ja annetaan hyytyä, jolloin solut fuusioituvat matriisiin ja alkavat jakaantua ja kasautua (**Kuva 3A**). (Nath ja Devi 2016; Pinto ja muut 2020.)

Edellä mainittuja menetelmiä on käytetty esimerkiksi paksusuolen-, haima-, eturauhas- ja rintasyövän tutkimiseen (Xu ja muut 2021). Matriisin päällisen ja matriisiin sulautetun soluviljelyn etuina on menetelmän yksinkertaisuus. Solut voidaan kerätä talteen

kasvatuksen jälkeen ja niiden kuvantaminen on helppoa, mikäli solut on viljelty matriisiin päällä. Toisaalta matriisiin sulautettujen solujen kerääminen, värjääminen ja kuvantaminen on haasteellista. Haasteita aiheuttaa myös se, että yksinkertaisuudestaan huolimatta hydrogeelien käsittely on vaativaa ja solut kasvavat upotettuina hitaammin ja eri kokoisiksi, minkä vuoksi kasvatukset täytyy lajitella ennen kuin määrittelyksiä voidaan suorittaa. (Nath ja Devi 2016; Pinto ja muut 2020.)

4.2 3D-biotulostus

3D-biotulostus on soluviljelymenetelmä, jossa soluista, hydrogeelistä ja kasvutekijöistä valmistetusta biomusteesta tuotetaan kolmiulotteisia rakenteita tulostamalla (**Kuva 3B**). Tulostettu kolmiulotteinen rakenne jäähmetetään sen koostumuksesta riippuen joko fyysisillä, kemiallisilla tai entsyymaattisilla menetelmillä. Jotta tulostetut kolmiulotteiset rakenteet olisivat tarkkoja ja korkealaatuisia, täytyy biomusteella olla hyvät viskoelastiset ominaisuudet. 3D-biotulostuksen menetelmillä on tutkittu esimerkiksi keuhko, maha ja munuaisyöpää ja potilasnäytteistä biotulostamalla valmistetut organoidit ovat reagoineet lääkeaineisiin samalla tavalla, kuin *in vivo* syöpäkasvain, josta solut ovat peräisin. (Jubelin ja muut 2022; Xin ja muut 2019.) Erilaisia 3D-biotulostusmenetelmiä ovat laser, mustesuihku ja pursotuspohjainen biotulostus (Albritton ja Miller 2017).

Laser-avusteisessa biotulostuksessa käytetään biomateriaalista valmistettua lahjoittajalevyä, joka on peitetty laserenergiaa sitovalla kerroksella. Haihtuessaan laserin vaikutuksesta tämä kerros siirtää lahjoittajalevyn materiaalin kasvualustalle. Lasertulostuksessa biomuste ja tulostin eivät ole yhteydessä toisiinsa, mikä mahdollistaa suuren solutiheyden ja korkean elinkelpoisuuden tulostettaville soluille. (Zhang ja muut 2021.)

Mustesuihkupohjainen biotulostus perustuu biomusteen levittämiseen halutulle alustalle joko jatkuvana syöttönä tai haluttaessa yksittäisinä pisaroina. Jatkuvassa syötössä biomustetta levitetään paineella suuttimesta, jolloin biomuste leviää useiksi pisaroiksi tulostettavalle alustalle. Pissaratulostuksessa biomustetta tulostetaan kasvualustalle pisara kerrallaan käyttäen apuna lämpöä, mikroventtiilejä tai piezosähköisiä menetelmiä. Mustesuihkupohjaisen biotulostuksen laatu voi heiketä, jos solut kasautuvat biomusteessa vaikuttaen pisaroiden muodostumiseen ja liikerataan. (Rider ja muut 2018.)

Pursotustulostuksessa biomuste puristetaan kasvualustalle lieriömäisinä juovina käyttäen apuna mekaanisia tai paineilmalla toimivia järjestelmiä. Biomustetta tulostetaan tasaisella paineella, jolloin sen syöttö on jatkuvaa, minkä seurauksena muodostuneesta kolmiulotteisesta rakenteesta tulee kestävä. Pursotustulostimella voidaan tulostaa monia eri viskositeettisia biomateriaaleja, joista korkean viskositeetin biomateriaalit toimivat tukina tulostetuille rakenteille, kun taas matalan viskositeetin biomateriaaleista voidaan valmistaa solujen toimintaa ja elinkelpoisuutta ylläpitävä ympäristö. (Jubelin ja muut 2022; Rider ja muut 2018; Zhang ja muut 2021.)

4.3 Mikrofluidinen alusta

Mikrofluidinen alusta -soluviljely perustuu solujen altistamiseen virtaavalle nesteelle. Mikrofluidinen alusta koostuu yleisesti polydimetyylisiloksaani (engl. *polydimethylsiloxane*, PDMS) sirusta, jonka sisällä on kanavia ja onkaloita soluväliainetta jäljentäville aineille kuten hydrogeelille (**Kuva 3C**). Solut istutetaan hydrogeeliin, jossa ne muodostavat sferoidin sekä kasvaimen mikroympäristön kuten *in vivo*. Hydrogeelin ympärillä kulkevat kanavat mallintavat verisuonistoa ja niissä kulkee ravinteita ja happea, ja kanavien avulla poistuu myös solujen aineenvaihdunnan seurauksena muodostuneita tuotteita. (Langhans 2018.) Mikrofluidiset alustat voivat olla yksinkertaisia sisältäen yhden tutkittavan solutyypin tai monimutkaisempia yhteisviljelyyn valmistettuja useamman solutyypin sisältäviä. Yhteisviljely voidaan suorittaa mikrofluidisilla alustoilla siten, että solut ovat joko kosketuksissa toisiinsa tai erillään, mutta samassa matriisissa. (Velasco ja muut 2020; Xin ja muut 2019).

Mikrofluidisilla alustoilla voidaan aktiivisen virtauksen ansiosta tutkia syöpäsolujen metastaasia, verisuoniston muodostumista ja sitä inhiboivien lääkkeiden vaikutuksia sekä virtausvoimien vaikutusta immuunisoluihin. Lisäksi mikrofluidiset alustat soveltuvat kasvainsolujen ja stroomasolujen välisten vuorovaikutusten tutkimiseen sellaisessa tilanteessa, jossa solut eivät ole suoraan kosketuksissa toisiinsa. (Barbosa ja muut 2022; Xin ja muut 2019; Xu ja muut 2021.) Mikrofluidisten alustojen valmistaminen PDMS:stä on kustannustehokasta ja sen kaasunläpäisevyys on korkea. PDMS kuitenkin kestää huonosti erilaisia liuottimia ja korkea kaasunläpäisevyys voi myös olla ongelmallista, sillä se edistää haihtumista. (Jubelin ja muut 2022; Pinto ja muut 2020.)

4.4 Mikrokuvioitu levy

Mikrokuvioitu levy -soluviljelyssä kasvatusalusta voidaan tehdä erilaisin menetelmin, kuten mikrokontaktitulostuksella tai suoralla valokuvakuviointilla. Kasvatusalustaan valmistettavat mikrokaivot ovat samanlaisia keskenään ja niiden koko vaihtelee 150–600 µm välillä. Mikrokuvioidut levyt tuottavat suuren määrän homogeenisiä sferoideja, minkä ansiosta menetelmä soveltuu korkean suorituskyvyn määrittäykseen. (Nath ja Devi 2016; Velasco ja muut 2020.)

Mikrokontaktitulostuksessa kasvualustaan, esimerkiksi akryylilevyyn, jyrsitään PDMS-leimalle sopivat mikrokaivot ja PDMS-leimaa käyttäen niiden pohjaan painetaan alusta soluväliaineen proteiineista kuten fibronectiinistä ja gelatiinista muodostamaan kiinnityskohtia viljeltäville soluille. Solususpensiota pipetoidaan mikrokaivoihin, jolloin solut kiinnittyvät proteiinalustaan ja solut kasautuvat. (Velasco ja muut 2020.)

Suorassa valokuvakuviointissa kasvatusalusta koostuu lasilevystä, jonka päälle levitetään kerros 3-trimetoksisilylipolymetakrylaattia (engl. 3-trimethoxysilyl polymethacrylate, TMS-PA). TMS-PA -kerroksen tarkoituksena on sitoa ja kiinnittää hydrogeeli kovalenttisesti lasiseen kasvualustaan. Tämän jälkeen hydrogeeli lisätään kasvatusalustaan ja siihen painetaan PDMS-leimasin, joka valmistaa mikrokaivot suoraan hydrogeeliin (**Kuva 3D**). Suora valokuvauskuvointi hyödyntää UV-valon kykyä tuottaa reaktiivisia happilaleja, joiden vaikutuksesta hydrogeelissä soluväliaineen proteiinit tarttuvat viljeltäviin soluihin. Hydrogeeliin painettuihin mikrokaivoihin ei siis tarvitse erikseen lisätä soluväliaineen proteiineja, jotta viljeltävät solut sitoutuisivat niihin. (Nath ja Devi 2016.)

5 Yhteenveto

3D-soluviljelymallit ovat monipuolisten ominaisuuksiensa ansiosta onnistuneet mallintamaan syöpäkasvaimia paremmin kuin 2D-soluviljelymallit, ja niistä on tulossa vakiintuneita työkaluja syöpätutkimuksessa. Jokaisella 3D-soluviljelymallilla on kuitenkin muihin vastaaviin soluviljelymalleihin verrattuna omat vahvuutensa ja heikkoutensa, jotka on otettava huomioon, kun tutkimusta suunnitellaan ja siihen sopivaa kasvatustekniikkaa valitaan.

3D-soluviljelymallien kyky tuottaa kolmiulotteisia sferoideja ja organoideja, joissa on heterogeenistä solukkoa, monimutkaista solusignaalointia, vuorovaikutuksia solujen ja soluväliaineen välillä, happi- ja ravintoainegradientteja sekä lääkeresistenssiä ovat mahdollistaneet todennäköisemmän tiedon lääkkeiden terapeuttisista vaikutuksista ja niiden turvallisuudesta. Todennäköisen tiedon saaminen edesauttaa lääkekehityksen kohdentamista oikeaan suuntaan, minkä johdosta uusien, terapeuttisesti tehokkaampien syöpälääkkeiden kehittäminen voi nopeutua moninkertaisesti verrattuna siihen, että saatu tieto olisi virheellistä. Lisäksi potilasnäytteistä valmistettujen organoidien ja niiden *in vivo* isäntäkasvainten samankaltainen reagointi lääkkeisiin antaa viitteitä siitä, että tulevaisuudessa potilaskohtaisten täsmälääkkeiden olemassaolo on mahdollista ja syöpäpotilaita voitaisiin hoitaa henkilökohtaisilla lääkkeillä.

Lähteet

- Albritton, J. L. & Miller, J. S. (2017) 3D bioprinting: Improving in vitro models of metastasis with heterogeneous tumor microenvironments. *Dis Model Mech* **10**:3–14.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. & Noel, G. (2015) Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int J Mol Sci* **16**:5517–5527.
- Barbosa, M. A. G., Xavier, C. P. R., Pereira, R. F., Petrikaite, V. & Vasconcelos, M. H. (2022) 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *CANCERS* **14**:190.
- Breslin, S. & O’Driscoll, L. (2013) Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* **18**:240–249.
- Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P. & Correia, I. J. (2016) 3D tumor spheroids: An overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv* **34**:1427–1441.
- El Harane, S., Zidi, B., El Harane, N., Krause, K.-H., Matthes, T. & Preynat-Seauve, O. (2023) Cancer Spheroids and Organoids as Novel Tools for Research and Therapy: State of the Art and Challenges to Guide Precision Medicine. *Cells* **12**:1001.
- Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**:4195–4200.
- Gunti, S., Hoke, A. T. K., Vu, K. P. & London, N. R. (2021) Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers* **13**:874.
- Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F. & Delort, L. (2021) 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci* **22**:12200.
- Harrison, R. K. (2016) Phase II and phase III failures: 2013–2015. *Nat Rev Drug Discov* **15**:817–818.
- Jensen, C. & Teng, Y. (2020) Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci* **7**. Noudettu osoitteesta <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.00033>

- Jubelin, C., Muñoz-Garcia, J., Griscom, L., Cochonneau, D., Ollivier, E., Heymann, M.-F., ... Heymann, D. (2022) Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell Biosci* **12**:155.
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., ... Lamperska, K. (2018) 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* **14**:910–919.
- Kular, J. K., Basu, S. & Sharma, R. I. (2014) The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng* **5**:2041731414557112.
- Langhans, S. A. (2018) Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol* **9**. Noudettu osoitteesta <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00006>
- Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H. & Xu, X. (2017) Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review). *Oncol Lett* **14**:6999–7010.
- Nath, S. & Devi, G. R. (2016) Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther* **163**:94–108.
- Peitzsch, C., Tyutyunnykova, A., Pantel, K. & Dubrovskaya, A. (2017) Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Semin Cancer Biol* **44**:10–24.
- Perche, F. & Torchilin, V. P. (2012) Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols. *Cancer Biol Ther* **13**:1205–1213.
- Pinto, B., Henriques, A. C., Silva, P. M. A. & Bousbaa, H. (2020) Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research. *Pharmaceutics* **12**:1186.
- Rider, P., Kačarević, Ž. P., Alkildani, S., Retnasingh, S. & Barbeck, M. (2018) Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *J Tissue Eng* **9**:2041731418802090.
- Salinas-Vera, Y. M., Valdés, J., Pérez-Navarro, Y., Mandujano-Lazaro, G., Marchat, L. A., Ramos-Payán, R., ... López-Camarillo, C. (2022) Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. *Front Oncol* **12**. Noudettu osoitteesta <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.826113>

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**:209–249.
- Tomás-Bort, E., Kieler, M., Sharma, S., Candido, J. B. & Loessner, D. (2020) 3D approaches to model the tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Theranostics* **10**:5074–5089.
- Van Zundert, I., Fortuni, B. & Rocha, S. (2020) From 2D to 3D Cancer Cell Models—The Enigmas of Drug Delivery Research. *Nanomaterials* **10**:2236.
- Velasco, V., Shariati, S. A. & Esfandyarpour, R. (2020) Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsyst Nanoeng* **6**:1–13.
- Xin, X., Yang, H., Zhang, F. & Yang, S.-T. (2019) 3D cell coculture tumor model: A promising approach for future cancer drug discovery. *Process Biochem* **78**:148–160.
- Xu, R., Zhou, X., Wang, S. & Trinkle, C. (2021) Tumor organoid models in precision medicine and investigating cancer-stromal interactions. *Pharmacol Ther* **218**:107668.
- Zhang, J., Wehrle, E., Rubert, M. & Müller, R. (2021) 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors. *Int J Mol Sci* **22**:3971.