

Trodimenzionalni stanični modeli središnjeg živčanog sustava

Miščević, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:023123>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**

Repository / Repozitorij:

BIotech

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Nikolina Mišćević

Trodimenzionalni stanični modeli središnjeg živčanog sustava

Završni rad

Rijeka, 2023.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Preddiplomski sveučilišni studij

„Biotehnologija i istraživanje lijekova“

Nikolina Mišćević

Trodimenzionalni stanični modeli središnjeg živčanog sustava

Završni rad

Rijeka, 2023.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Jelena Ban

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Undergraduate programme
„Biotechnology and drug research“

Nikolina Mišćević

Three- dimensional cell models of the central nervous system

Undergraduate thesis

Rijeka, 2023.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jelena Ban

Završni rad obranjen je dana 21. rujna 2023. godine

pred povjerenstvom:

1. doc. dr. sc. Željka Maglica
2. prof. dr. sc. Mladen Merćep
3. izv. prof. dr. sc. Jelena Ban
4. prof. dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac – zamjenski član/ica

Rad ima 34 stranice, 6 slika, i 32 literaturna navoda

Sažetak

Povećanje stope smrtnosti na globalnoj razini uzrokovane neurodegenerativnim bolestima potaknulo je svijet znanosti na kreiranje znanstvene metode dovoljno jednostavne za izradu, a pritom dovoljno kompleksne za obuhvaćanje karakteristika središnjeg živčanog sustava (SŽS). Neadekvatnost postojećih životinjskih i dvodimenzionalnih (2D) modela korištenih za ispitivanje složenosti patogeneza bolesti koje zahvaćaju SŽS dovela je do razvoja trodimenzionalnih (3D) staničnih kultura.

3D stanični modeli SŽS-a generiraju se iz pluripotentnih stanica koje se daljnjim usmjeravanjem diferenciraju u neurone, astrocite ili oligodendrocite. Navedene pluripotentne stanice uključuju embrionalne i neuralne matične stanice, ali i umjetno inducirane pluripotentne matične stanice. Nakon što su stanice prikupljene iz embrionalnih tkiva ili pak zdravih ili bolesnih odraslih jedinki, kultiviraju se *in vitro* u odgovarajućim uvjetima kako bi se osigurao razvoj, rast i daljnja proliferacija. Ovisno o kojim stanicama je riječ, dovode se pripadni faktori u staničnu kulturu koji potiču diferencijaciju stanica do vrste potrebne za istraživanje. 3D modeli nadalje se formiraju sa ili bez nosača prirodnog ili sintetskog podrijetla koji može služiti kao strukturna potpora kultiviranim stanicama. Materijali korišteni nužno moraju biti biokompatibilni kako ne bi došlo do negativnih utjecaja na stanice kulture ili pak živi organizam.

Laboratorijska metoda izrade 3D modela SŽS-a koristi se u svrhe proučavanja mehanizama neurodegenerativnih poremećaja te njihovih nastanaka i napredovanja u organizmu. Izrada modela mehanizama raka koji pogađaju stanice SŽS-a te ispitivanje potencijalnih farmakoterapija također ulaze u repertoar uloga koje obnašaju 3D stanični modeli. Od samoformirajućih sferoida do sofisticiranih organa na čipu, 3D modeli SŽS-a odlikuju se različitim stupnjem uniformnosti bioloških karakteristika. Glavni cilj pri izradi ovih modela je stvoriti sustav što autentičniji stanicama i tkivima *in vivo*. Usprkos jedinstvenim svojstvima, 3D modeli odlikuju se i

manjkavostima poput nedostatka vaskularizacije te visokim troškom proizvodnje usporedno s 2D modelima. 3D staničnim modelima potrebno je usavršavanje no unatoč tomu od svoje prve uporabe predstavljaju ulaznicu u svijet istraživanja složeno dizajniranog ljudskog živčanog sustava.

Ključne riječi: matične stanice, središnji živčani sustav, trodimenzionalni stanični model, biomaterijal, biokompatibilnost

Summary

The increase in the global mortality rate caused by neurodegenerative diseases has prompted the world of science to create a scientific method that is simple enough to create, yet complex enough to capture the characteristics of the central nervous system (CNS). The inadequacy of existing animal and two-dimensional (2D) models used to investigate the complexity of the pathogenesis of diseases affecting the CNS led to the development of three-dimensional (3D) cell cultures.

3D cell models of the CNS are generated from pluripotent cells, which are differentiated into neurons, astrocytes or oligodendrocytes by further targeting. Pluripotent cells include embryonic and neural stem cells, but also artificially induced pluripotent stem cells. After the cells have been collected from embryonic tissues or from healthy or diseased adults, they are cultivated *in vitro* under appropriate conditions to ensure development, growth and further proliferation. Depending on the cells in question, relevant factors are brought into the cell culture that stimulate the differentiation of the cells to the type required for research. 3D models are further formed with or without scaffolds of natural or synthetic origin that can serve as structural support for cultured cells. The materials used must necessarily be biocompatible so that there is no adverse interaction with cultured cells or a living organism.

The laboratory method of creating 3D models of the CNS is used for the purpose of studying the mechanisms of neurodegenerative disorders and their development as well as progression in the body. The development of models of cancer mechanisms that affect the cells of the CNS and the examination of potential pharmacotherapies also enter the repertoire of roles played by 3D cell models. From self-forming spheroids to sophisticated organs-on-a-chip, 3D models of the CNS are characterized by varying degrees of uniformity of biological characteristics. The main goal when creating these models is to create a system as authentic as possible to cells and tissues *in vivo*. Despite their unique properties, 3D models are

also characterized by shortcomings such as the lack of vascularization and the high cost of production compared to 2D models. 3D cell models need improvement, but despite this, since their first use, they represent a ticket to the world of research into the complexly designed human nervous system.

Key words: stem cells, central nervous system, three-dimensional cell model, biomaterial, biocompatibility

Popis kratica

AB – Alzheimerova bolest

BBB- krvno-moždana barijera, engl. Blood Brain Barrier

BMPs- koštani morfogenetski proteini, engl. bone morphogenetic proteins

EB- embrionalno tjelešce, engl. embryoid body

ECM- izvanstanični matriks, engl. extracellular matrix

EMS- embrionalne matične stanice

FGF- faktor rasta fibroblasta, engl. fibroblast growth factor

HB – Huntingtonova bolest

hEMS- ljudske embrionalne matične stanice, engl. human embryonal stem cells

iPMS- inducirane pluripotentne matične stanice

LIF- faktor inhibicije leukemije, engl. leukemia inhibitory factor

mEMS- mišje embrionalne matične stanice

NMS- neuralne matične stanice

PB - Parkinsonova bolest

PMS- pluripotentne matične stanice

SMS- somatske matične stanice

SŽS- središnji živčani sustav

Wnt- engl. wingless- related integration site

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Svrha rada	4
3.	Matične stanice.....	5
3.1.	Neuralne matične stanice	6
3.1.1.	Uzgoj kultura neuralnih matičnih stanica iz EMS-a	6
3.2.	Inducirane pluripotentne matične stanice.....	8
4.	Trodimenzionalni stanični modeli.....	10
4.1.	Biomaterijali.....	12
4.2.	Trodimenzionalni stanični modeli središnjeg živčanog sustava ...	17
4.2.1.	Organodi i sferoidi	22
4.2.2.	3D bioprintani modeli.....	24
4.2.3.	Organi na čipu.....	26
4.2.4.	Nedostaci trodimenzionalnih staničnih modela SŽS-a.....	27
5.	Primjena 3D staničnih modela SŽS-a	28
6.	Zaključak	29
7.	Literatura	30
8.	Životopis	34

1. Uvod

Jedinstvenost strukture i funkcije ljudskog živčanog sustava ogledni je primjer preciznog i savršeno funkcionalnog mehanizma. Mozak, kao jedan od centralnih dijelova ljudskog organizma, može se smatrati prozorom kroz koji znanstvenici već stoljećima pokušavaju zaći u kompleksnost ljudskih bića. Sam ljudski mozak jedan je od strukturno najsloženijih organa poznatih znanosti te je nedvojbeno ključna komponenta ljudskog identiteta. Izučavanje i razumijevanje ovog organa, ali i čitavog središnjeg živčanog sustava (SŽS), stepenica je više ka razumijevanju zašto smo kao vrsta jedinstveni u kognitivnim sposobnostima [1].

Brojni faktori, koje bi ujedno mogli i nazvati atributima SŽS-a, obilježavaju njegovu složenost. Evolucijska povijest ljudskog SŽS-a oblikovana je milijunima godina prilagodbe i prirodne selekcije. Evolucijski pritisci za preživljavanjem, društvenom interakcijom i složenim ponašanjima potaknuli su razvoj raznolikog i sofisticiranog živčanog sustava. Ljudski SŽS sastoji se od bilijuna neurona, od kojih svaki ima jedinstvena svojstva i obrasce povezivanja. SŽS okarakteriziran je i regionalnom specijalizacijom te složenošću neuronske mreže zahvaljujući kojima se odvija složena obrada i prijenos informacija. Neuroplastičnost i razvojna složenost SŽS-a uz prethodno navedene karakteristike, čimbenici su koji su omogućili ljudskim bićima prilagodljivost različitim okruženjima, a posljedično tome i produljenje životnog vijeka.

Prosječni životni vijek čovjeka raste iz godine u godinu, a od 2022. do 2023. godine porastao je za 0,24% te sada na svjetskoj razini iznosi 73,16 godina [2]. Ovoj statistici pridonijeli su brojni faktori koji su omogućili bolju kvalitetu življenja od kojih se pravilna i kvalitetnija zdravstvena skrb ističe kao jedna od ključnih. Produljenje vijeka življenja posljedično je rezultiralo promjenama u prevalenciji i tipu bolesti koje pogađaju ljudsku populaciju. Iako je produljenje ljudskog vijeka donijelo značajne prednosti, ono je također prouzročilo nove izazove povezane s neurološkim zdravljem.

Proces starenja sa sobom povlači pojavu nakupljanja mnogobrojnih patoloških stanja poput cerebrovaskularnih bolesti, ali i neurodegeneraciju. Sve učestaliji su neurološki poremećaji koji zahvaćaju (češće) stariju populaciju poput polineuropatije, moždanog udara, demencije, Alzheimerove bolesti (AB) i Parkinsonove bolesti (PB) [3]. Prema izvješću objavljenom od strane Ujedinjenih naroda zabilježen je znatan porast u broju starije populacije gdje se procjenjuje da će do 2050. godine 1 od 6 osoba svjetske populacije biti starija od 65 godina. Kako svjetska populacija stari, prevalencija neurodegenerativnih poremećaja, uključujući AB i PB, brzo raste. Naime, predviđa se da će broj slučajeva demencije u razvijenim zemljama porasti s 13,5 milijuna u 2000. godini na 21,2 milijuna u 2025. i na 36,7 milijuna u 2050. godini. Broj smrti uzrokovanih AB-om sada je na razini broja smrti uzrokovanih moždanim udarom, koji je treći najčešći uzrok smrti u svijetu.

Nažalost, znanstvenici još uvijek ne razumiju u potpunosti patogenezu AB i drugih neurodegenerativnih poremećaja zbog čega još uvijek nedostaje pouzdanih markera rane dijagnoze, a posljedično tome i učinkovite terapije za navedene bolesti [4].

Dosadašnje spoznaje patogeneze pojedinih neurodegenerativnih poremećaja otkrivene su uz pomoć studija provedenih na životinjskim modelima. Uzorke ljudskog tkiva koji vjerodostojno predstavljaju pojedine faze neurorazvoja teško je očuvati što čini životinjske modele pristupačnijom materijom za istraživanja koja nam omogućuje da u kraćem vremenskom periodu uočimo razvitak pojedine bolesti. Unatoč njihovoj pristupačnosti, ovakav tip modela ne može u potpunosti vjerodostojno obuhvatiti molekularne mehanizme bolesti u ljudskom organizmu.

Uz nerazjašnjenost mehanizama djelovanja neurodegenerativnih bolesti na molekularnoj razini, razvitak terapija nerijetko je neuspješan i na razini kliničkih istraživanja. Glavni razlog tomu jest visoka selektivnost propusnosti krvno-moždane barijere (eng. Blood Brain Barrier – BBB). Ona predstavlja svojevrsnu granicu i filter koji sprječava da pojedine toksične

tvari, ali i lijekovi, dospiju u mozak čineći razvoj terapija za ovaj tip bolesti izuzetno izazovnim.

Zbog jedinstvenosti prirode ljudskog živčanog sustava i manjkavosti često korištenih životinjskih modelnih organizama, javlja se potreba za razvojem naprednijih *in vitro* modela koji su sposobniji vjerno modelirati složene strukture unutar mozga i živčanog sustava općenito [5]. Jedan od glavnih problema koji se javlja kod *in vitro* ispitivanja je nepotpun prikaz okoliša u kojem se stanice, a posljedično tomu, i tkiva i organi nalaze.

Moguća rješenja za što vjerodostojniju projekciju rezultata dobivenih *in vitro* u *in vivo* okruženje kriju se u dvodimenzionalnim (2D) i trodimenzionalnim (3D) staničnim modelima. 2D stanične kulture iznimno su vrijedan alat koji znanosti doprinosi već više od sto godina predstavljajući ekonomičnu i pojednostavljenju metodu za modeliranje bolesti koje zahvaćaju SŽS. 2D stanični modeli koji već nekoliko godina uspješno pomažu pri modeliranju i ispitivanju neurodegenerativnih poremećaja su kulture pluripotentnih matičnih stanica [6]. Unatoč činjenici da 2D modeli daju izvanredan uvid u funkcionalnu aktivnost neuronskih mreža, oni ne prikazuju trodimenzionalnu izvornu strukturu tkiva koja ima dominantnu ulogu u staničnoj funkciji [5].

U današnjem dobu dolazi do potrebe za modelima koji će služiti kao pouzdan temelj za ispitivanje neuralnih stanica. Zadnjih godina tu ulogu preuzimaju 3D modeli koji sve uspješnije obuhvaćaju kompleksnu strukturu ljudskog živčanog sustava. Predstavljaju realističnije modele koji bi mogli ispuniti postojeći jaz između 2D staničnih kultura i životinjskih modela [6]. 3D modeli su u sve učestalijoj uporabi za otkriće i ispitivanje lijekova, modeliranje bolesti kao i u inženjeringu tkiva te regenerativnoj medicini. Pronalazak adekvatnih terapija za poremećaje SŽS-a nailazi na brojne izazove posljedično čemu neuroznanost i moderna medicina imaju cilj razvijanja novih metoda izučavanja molekularnih mehanizama neurodegenerativnih bolesti. Alat koji predstavlja veliki potencijal pri tome upravo su 3D stanični modeli bazirani na pluripotentnim i neuralnim

matičnim stanicama. Kreiranje ovih modela nedvojbeno je korak bliže ka razotkrivanju kompleksnosti patogeneza mnogih bolesti novog doba.

2. Svrha rada

3D stanični modeli relativno su novija tehnologija korištena pri laboratorijskim istraživanjima te je svrha ovog rada objediniti informacije o 3D staničnim modelima u uporabi s naglaskom na modele korištene za izučavanje SŽS-a. Složenost i jedinstvenost SŽS-a ljudskih bića do 1970-ih godina bila je izučavana uz pomoć 2D modela koji nisu sposobni obuhvatiti prirodnu strukturu stanica i njihovu interakciju sa izvanstaničnim okolišem. 3D modeli posebno su aktualni pri istraživanju patogeneze bolesti koje pogađaju SŽS, jer autentičnije prikazuju mikro i makro okoliš živčanih stanica. Koriste se i pri modeliranju bolesti te istraživanju potencijalnih farmakoterapija. Navedeni modeli imaju i osobitu ulogu pri istraživanju tumora što ih čini izuzetno vrijednom alatkom u modernom svijetu znanosti.

Obzirom na mnoga recentna znanstvena otkrića na području neuroznanosti važno je provoditi kritični osvrt na objavljenu literaturu kako bi se izdvojili relevantni rezultati za kreiranje 3D prikaza stanica živčanog sustava. Izrada 3D staničnih modela SŽS-a iziskuje interdisciplinarni pristup povezujući brojne grane znanosti kako bi se rekreirao tek dio kompleksnosti ljudskog organizma, stoga je nužno objediniti dosadašnje spoznaje relevantne za formaciju 3D modela.

3. Matične stanice

Matične stanice nespécializirane su stanice ljudskog organizma čije jedinstvene karakteristike omogućuju brojna nova otkrića u području regenerativne medicine i istraživanja lijekova. Karakterizira ih sposobnost samoobnavljanja putem mitotičke diobe i diferencijacije u različite vrste stanica ljudskog tijela [7]. No, sposobnost samoobnavljanja i podupiranja homeostaze ugrožena je starenjem organizma i nizom intrinzičnih ozljeda, DNA aberacija te modifikacijama mikrokruženja tkiva. Klasifikacija matičnih stanica najčešće se svodi na podjelu stanica prema stupnju razvojnog odnosno diferencijacijskog potencijala (engl. developmental potency) zahvaljujući kojem ih možemo podijeliti na totipotentne, pluripotentne, multipotentne, oligopotentne i unipotentne.

Totipotentne matične stanice mogu se dijeliti i diferencirati u sve vrste stanica ljudskog organizma što im pridaje najviši stupanj diferencijacije. Primjer ovakvog tipa matične stanice je zigota koja nakon otprilike pet dana od inicijalne oplodnje prelazi u blastocistu čija je unutarnja stanična masa (engl. inner cell mass – ICM) izvor pluripotentnih stanica [8]. Upravo je unutarnja stanična masa, odnosno embrioblast, izvor embrionalnih pluripotentnih stanica korištenih za kultivaciju stanica pri znanstvenim istraživanjima.

Još jedan primjer pluripotentnih stanica koji nam je u ovom slučaju važno naglasiti su inducirane pluripotentne matične stanice (iPMS) čiji je potencijal diferenciranja umjetno stečen i kontinuiran. iPMS imaju sposobnost prelaska potom u multipotentne, oligopotentne ili unipotentne matične stanice gdje svaka od njih ima sve niži stupanj diferencijacije. Nakon embrionalnog razvoja, tijelo sadrži odrasle somatske matične stanice (SMS) odnosno nediferencirane multipotentne stanice. One imaju sposobnost proliferacije i stvaranja sljedeće generacije matičnih stanica te pod specifičnim fiziološkim uvjetima, diferencirati se u specializirane stanice [9]. Također, SMS djeluju kao unutarnji sustavi „popravka“

organizma i zaslužne su za rast, zacjeljivanje i zamjenu stanica koje se svakodnevno izmjenjuju.

3.1. Neuralne matične stanice

Za potrebe formiranja 3D staničnih modela korištenih za ispitivanja i modeliranje bolesti te otkrivanja novih potencijalnih terapija neurodegenerativnih bolesti nužno je najprije prikupiti i kultivirati stanice. Kako i samo ime nalaže, pri istraživanju neurodegenerativnih poremećaja fokus se stavlja na praćenje mehanizma i razvitka bolesti koje utječu najvećim dijelom na neurone. Prethodnici neurona su neuralne matične stanice (NMS) koje nedvojbeno imaju važnu ulogu u kreiranju staničnih modela. Tijekom fetalnog neurorazvoja sisavaca, i u određenoj mjeri u postnatalnom razdoblju kroz odraslu dob, NMS ili neuralne progenitorne stanice (NPS) djeluju kao samoobnavljajuće stanice koje se mogu diferencirati u više vrsta moždanih stanica [10]. NMS su multipotentne, točnije tripotentne stanice sposobne diferencirati se u astrocite, oligodendrocite te neurone. Ova vrsta matičnih stanica nalazi se u specijaliziranim nišama u mozgu odraslih sisavaca definirane kao neurogene niše i obuhvaćaju subventrikularnu i subgranularnu zonu mozga. Upravo ove niše predstavljaju specijalizirani mikrokoliš čija je glavna svrha regulirati samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju NMS-a pritom održavajući homeostazu SŽS-a [11].

3.1.1. Uzgoj kultura neuralnih matičnih stanica iz EMS-a

Neuralne matične stanice korištene kao baza za daljnje stvaranje staničnih modela dobivaju se iz pluripotentnih stanica. Naime, za potrebe istraživanja NMS se dobivaju iz embrionalnih ili umjetno induciranih pluripotentnih matičnih stanica (engl. induced pluripotent stem cells- iPSC).

Kultivacija embrionalnih matičnih stanica (EMS) obuhvaća proces usmjerene diferencijacije tijekom koje se koriste specifični čimbenici rasta i uvjeti za kulturu kako bi se EMS usmjerile prema razvijanju u NMS. Ovaj

proces oponaša prirodni razvoj neuralne loze tijekom ranog embrionalnog razvoja. Dakle, potrebno je kultivirati EMS koje neće samo proliferirati, nego diferencirati u NMS.

EMS nalaze se u embrioplastu blastociste iz koje se izoliraju od trofoblasta zahvaljujući postupku imunokirurgije (engl. immunosurgery). Imunokirurgija je citotoksični postupak selektivnog uklanjanja vanjskog sloja stanica blastociste, odnosno trofoblasta uz pomoć antitijela. Antitijela se vežu na vanjski dio blastociste na koje se potom vezuju kompleменти imunološkog sustava i posljedično tomu se ekstrahiraju stanice embrioplasta.

Vrste EMS-a koje se koriste u istraživanjima su mišje embrionalne matične stanice (engl. mouse embryonic stem cells – mEMS) i ljudske embrionalne matične stanice (engl. human embryonic stem cells- hEMS). mEMS prvi su put opisane 1981. godine kada su izolirane iz unutarnje stanične mase blastociste kultivirane *in vitro* [12]. hEMS izolirane su prvi put 1998. godine iz unutarnje stanične mase embrija [13]. Kultivacija mEMS-a je jeftinija, pristupačnija te rjeđe postavlja pitanje etičnosti postupka za razliku od modificiranja i kultiviranja hEMS-a. Protokoli za kultivaciju neuralnih derivata iz EMS-a su u početku bili dizajnirani za mEMS, a potom su modificirani za primjenu na hEMS.

Iako su i mišje i ljudske EMS rane pluripotentne stanice nalik embriju, sposobne diferencirati se u derivate sva tri primarna zametna listića, one se razlikuju na nekoliko načina. Imaju različite potrebe za čimbenicima rasta gdje su mEMS potrebne regulacije faktora inhibicije leukemije (engl. leukemia inhibitory factor – LIF) i koštanih morfogenetskih proteina (engl. bone morphogenetic proteins –BMPs) dok je kod hEMS fokus na aktivinu i faktoru rasta fibroblasta (engl. fibroblast growth factor -FGF) [14].

Postupci diferencijacije EMS-a u NMS u laboratorijskim uvjetima mogu se svesti na izravnu (direktnu) i neizravnu (indirektnu) diferencijaciju. Za razliku od izravne diferencijacije, u kojoj je diferencijacija EMS-a usmjerena

na određene tipove stanica korištenjem specifičnih egzogenih kemikalija i čimbenika, neizravna diferencijacija većinski ovisi o endogenim čimbenicima i specifičnim signalnim putovima [15].

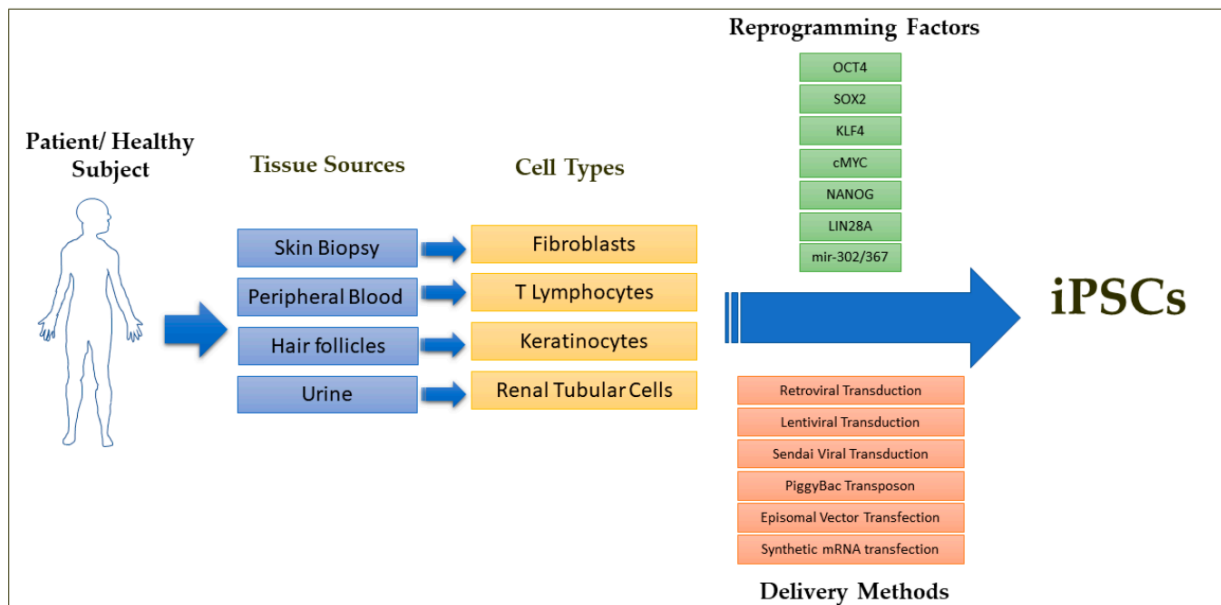
Kod izravne diferencijacije fokus je na aktivaciji Wnt (engl. Wingless-related integration site) signalnog puta, koji regulira samoobnavljanje i diferencijaciju EMS-a, te BMP-a koji potiču endodermalnu i mezodermalnu diferencijaciju [14]. FGF je također ključan faktor koji djeluje uz BMP kako bi se pojačala aktivnost Wnt signalnog puta i potaknula ekspresija neuralnih transkripcijskih faktora. Pritom se EMS tretira sa inhibitorima tzv. Activin/Nodal signalnog puta koji ima ulogu signalne kaskade koja uvelike utječe na široki spektar bioloških procesa uključujući organogenezu i diferencijaciju EMS-a u NMS. Primjer potentnog inhibitora ovog signalnog puta je Noggin protein. Posljedično ovime dolazi do pojačane ekspresije gena neuralne linije i predanosti razvojnoj sudbini neuralnih stanica.

Indirektna diferencijacija pak teži ka formaciji medijatora prije same diferencijacije EMS-a. Nediferenciranim stanicama EMS-a u kulturi se ukloni LIF te se potiče stvaranje EB-a (engl. embryoid body) odnosno višestaničnog trodimenzionalnog agregata koji sadrži djelomično diferencirane EMS i šupljinu uzrokovanu smrću stanica [15]. EB se usmjerava ka neuralnoj diferencijaciji uz pomoć retinoične kiseline (engl. retinoic acid) što rezultira nastankom stanica neuralnih progenitora.

3.2. Inducirane pluripotentne matične stanice

Za formiranje 3D modela korištenih za proučavanja neurodegenerativnih i neuroloških poremećaja osim EMS koriste se još i inducirane pluripotentne matične stanice (iPMS). iPMS su stanice generirane iz somatskih stanica odraslih jedinki. Tehnologija induciranja pluripotentnih matičnih stanica započela je 2006. godine kada su Shinya Yamanaka i njegov tim demonstrirali da se adultne/zrele stanice mogu reprogramirati kako bi im se vratilo svojstvo pluripotentnosti [16]. Somatske stanice, prikupljene

najčešće iz uzorka biopsije kože ili krvi pacijenata, reprogramiraju se tako što im se uvode transkripcijski faktori poput OCT4, SOX2, KLF4 i cMYC koji su sposobni potaknuti povratak somatskih stanica u matične stanice (Slika 1.). Transdukcija transkripcijskih faktora se može izvršiti uz pomoć virusnih vektora, rekombinantnih proteina te plazmidne DNA ili RNA [17].



Slika 1. Shematski prikaz izdvajanja iPSC-a iz pacijenta ili zdrave osobe- Među metodama navedenim za ispostavu transkripcijskih faktora episomalna DNA i Sendai virus metode su koje se najčešće koriste pri kliničkim izdvajanjima iPSC-a. Što se tiče faktora nužnih za reprogramiranje iPSC-a, najčešće se koriste kombinacije transkripcijskih faktora koje ne sadrže c-Myc (transkripcijski faktor koji ima važnu ulogu pri regulaciji genske ekspresije i kontroliranju staničnih procesa poput diferencijacije); Slika preuzeta iz : Doss MX, Sachinidis A. Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications. Cells [Internet]. 2019;8(5):403.

iPSC se mogu samoobnavljati i diferencirati u različite stanične linije poput ostalih matičnih stanica. Uz odgovarajuću stimulaciju i transkripcijske faktore mogu se potaknuti u diferencijaciju željenih stanica poput NSC-a za potrebe izrade neurosfera ili organoida.

Otkriće i uporaba iPSC-a omogućili su kultivaciju stanica koje se mogu beskonačno mnogo proliferirati i formirati u bilo koju stanicu ljudskog tijela. Također, inducirane stanice otvorile su vrata jednostavnijem modeliranju

bolesti tako što se mogu reprogramirati somatske stanice pacijenata koje nose gene povezane s određenom bolešću. Od 2007. godine uporaba iPMS-a uvelike je pridonijela istraživanju neurodegenerativnih bolesti poput AB-a, PB-a, amiotrofične lateralne skleroze i Huntingtonove bolesti (HB). Modeli kreirani uz pomoć iPMS-a, zahvaljujući kojima se vrši probir lijekova, imaju veliki potencijal premostiti jaz između pretkliničnih i kliničkih istraživanja neurodegenerativnih poremećaja [17].

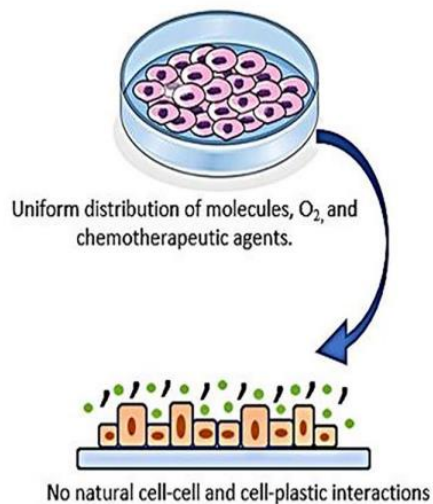
4. Trodimenzionalni stanični modeli

Posljednjih nekoliko desetljeća postupno se događa poprilično drastična promjena u svijetu znanstvenih istraživanja. Etične dvojbe i zaključci istraživanja baziranih isključivo ili većinski na životinjskim modelima, koja nikada neće u potpunosti obuhvatiti kompleksnost bioloških procesa ljudskih bića, doveli su znanstvenike pred novi izazov. Postepeno udaljšavanje od životinjskih modela pri znanstvenim ispitivanjima također je bilo potaknuto i novim regulativama čija su svrha ne-životinjski bazirana istraživanja čime je došlo do potrebe za alternativnim pristupom.

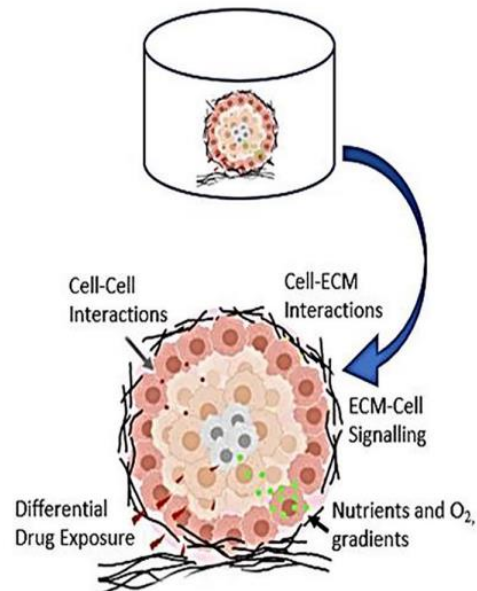
Stanične kulture metoda su koja se koristi pri istraživanjima već dugi niz godina. Bilo je poprilično jasno da će od prve izolacije pluripotentnih stanica 80-ih godina prošlog stoljeća i tvorbe kulture stanica ova metoda, kao primjer biološkog testa i analize, biti od velikog značaja u svijetu znanosti. Tipične kulture jednoslojnih stanica imaju široku primjenu kao *in vitro* metoda, no nedostaje im vjerodostojan prikaz jedinstvenosti stanične arhitekture i kompleksnosti staničnih bioloških procesa. 2D jednoslojne stanične kulture uz životinjske modele nedostatna su metoda za današnja ispitivanja staničnih mehanizama na koje utječe i sam stanični mikrookoliš. 2D stanične kulture kultiviraju se na statičnoj, krutoj podlozi tzv. monosloju (engl. monolayer) za razliku od 3D kultura koje tvore plastične strukture u prostoru (Slika 2). Tradicionalni monosloj sadrži proliferirajuće stanice čija morfologija ne prikazuje njihovu vjerodostojnu strukturu i međudnos sa

ostalim stanicama kao *in vivo*. Upravo zbog takve manjkavosti pojedini stanični procesi poput proliferacije, diferencijacije ili apoptoze mogu se pojaviti abnormalno ili neispravno [18].

A. 2D Cell Culture



B. 3D Cell Culture



Slika 2. 2D (A) vs 3D (B) stanična kultura – stanice prikupljene iz tkiva donora mogu se uzgajati u višestaničnoj 3D kulturi koja ispravnije oponaša roditeljsku stanicu nego u jednostavnijoj 2D kulturi. 3D modeli sposobni su stvoriti interakciju između stanica kao i sa vanjskim okolišem. U kulturi prikazanoj na (B) morfologija i polaritet su bolje očuvani. Čimbenici poput opskrbe kisikom i dotoka hranjivih tvari jednostavno se manipuliraju za pojedini eksperiment kako bi se pritom optimizirali svi uvjeti potrebni za djelovanje efektorskih molekula. Proliferacija stanica ovisi u položaju stanica u kultivacijskoj posudi. ; Slika preuzeta iz: Biju TS, Priya VV, Francis AP. Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostics: an updated review. Drug Deliv Transl Res

3D stanične kulture stupaju na znanstvenu scenu unatrag nekoliko desetljeća kao metoda sa visokim potencijalom obuhvaćanja heterogenosti, strukture i funkcija embrionalnih tkiva i tkiva odraslih jedinki. Godine 1970. Hamburg i Salmon kreirali su po prvi put 3D kulturu stanica na agar gelu koja je pokazala potencijal oponašanja morfološke prirode stanica *in vivo* [19]. 3D stanična kultura može se definirati kao kultura stanica koja je sposobna oponašati i obuhvatiti organizaciju i tzv. mikroarhitekturu (engl.

microarchitecture) živog organa [18]. Formiranje 3D kulture stanica označava pružanje prikladnog mikrookruženja za optimalan rast stanica, diferencijaciju i funkciju te sposobnost stvaranja tvorevina nalik tkivu *in vitro* [20]. To se postiže dopuštanjem pojedinačnim stanicama da zadrže svoju normalnu strukturu i oblik uz minimalnu egzogenu podršku i smetnje. Stanice se potiču na formiranje složenih interakcija sa okolnim stanicama kroz primanje i „odašiljanje“ signala [20].

3D stanični model širi je pojam koji se odnosi na svojevrsno utjelovljenje biološkog procesa ili strukture u tri dimenzije. To može obuhvaćati strukture koje oponašaju tkiva, organe ili čitav mehanizam određene bolesti. Ovakav tip modela koristi se kao alat pri proučavanju patogeneze bolesti ili pak testiranju potencijalnih farmakoterapija u kontroliranim uvjetima.

4.1. Biomaterijali

U kontekstu 3D staničnih modela i tkivnog inženjerstva, pojam biomaterijal se odnosi na tvari ili materijale čija je uloga interakcija s biološkim sustavima poput stanica i tkiva. Koriste se za stvaranje struktura koje podržavaju rast, organizaciju i funkcionalnost u trodimenzionalnim okruženjima (Slika 3).

Napredak u bioinženjeringu dao je doprinos u kontekstu boljitka 3D staničnih modela time što je razvijen sustav tzv. „skela“ odnosno nosača (engl. scaffold) koji oponašaju mikrookoliš u kojem stanice prirodno borave, podržavajući pritom mehaničke, fizičke i biokemijske zahtjeve za stanični rast i pravilnu funkcionalnost [18]. Nosači u ovom kontekstu su biopolimeri koji se koriste u tehnici 3D stanične kulture kako bi oponašali izvanstaničnu matricu (engl. extracellular matrix – ECM). *In vivo*, stanice rastu unutar ove složene i bioaktivne hidrogelne skele koja pruža mehaničku potporu dok usmjerava staničnu adheziju, proliferaciju, diferencijaciju, morfologiju i ekspresiju gena. Replikacija izvanstanične matrice od iznimne je važnosti, jer se kreira okoliš gdje dolazi do primanja signala koji stanice usmjeravaju prema njihovoj diferencijaciji ili

proliferaciji. Pristupi kreiranja 3D staničnih kultura, a posljedično tomu i staničnih modela, općenito se mogu kategorizirati na sustave staničnih kultura koji ne koriste nosače i sustave koji su bazirani na skelama izrađenim od prirodnih ili sintetičkih materijala. Kulture koje ne koriste nosače mogu se klasificirati i na suspenzijske kulture na neadhezivnim pločama i kulture u koncentriranom mediju ili strukturama sličnim gelu.

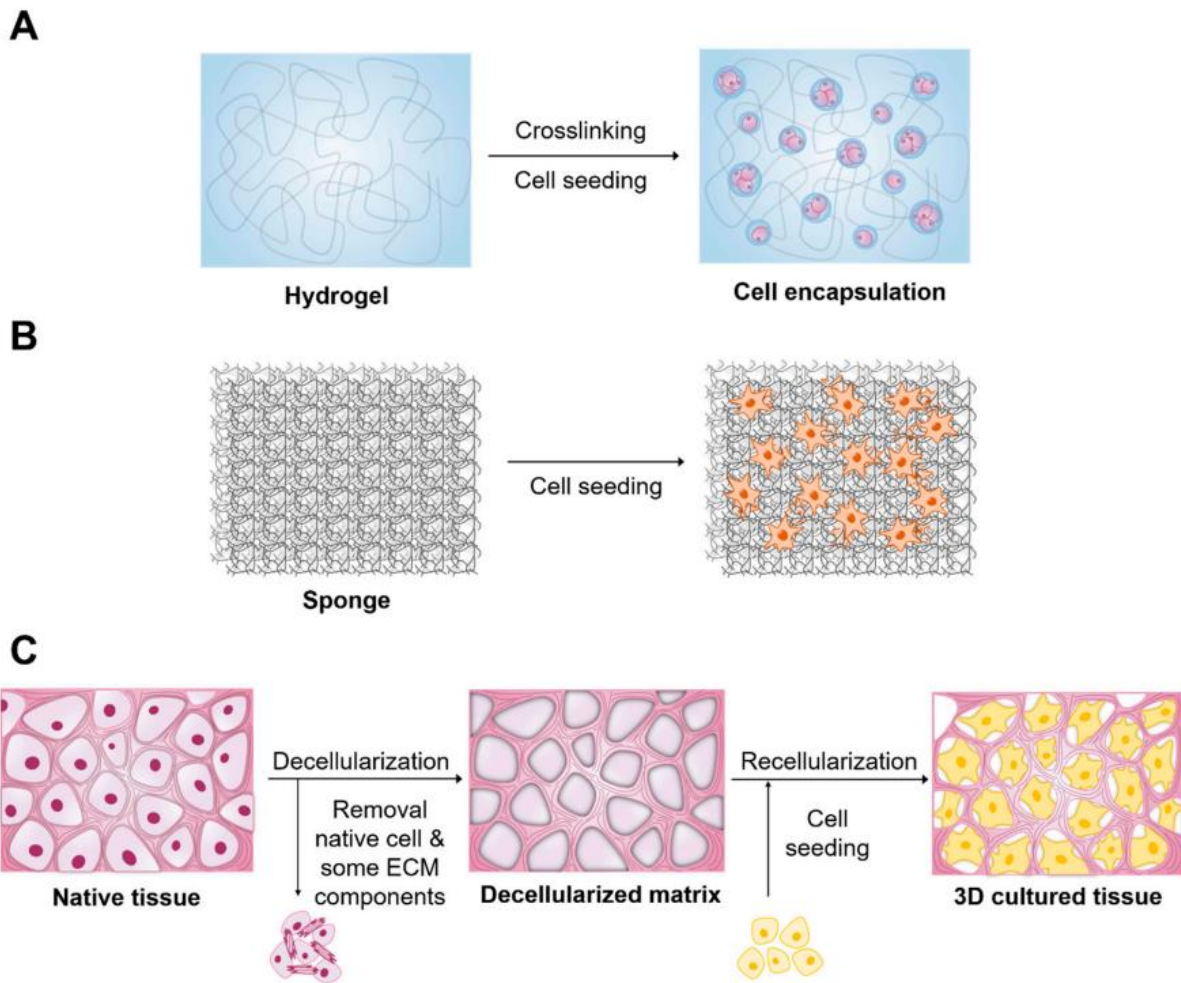
Prirodni biomaterijali korišteni za 3D modele ovisne o nosačima često se temelje na različitim komponentama izvanstanične matrice (ECM) kao što su kolagen, fibrin i hijaluronska kiselina, no koriste se i drugi materijali prirodnog podrijetla poput svile, želatine i alginata. Navedeni materijali su biokompatibilni i posjeduju svojstvo stanične adhezije. Nužno je da su materijali koji se koriste biokompatibilni odnosno da ne stupaju u negativnu interakciju sa stanicama kako ne bi izazvali štetne učinke.

„Skele“ izrađene od sintetičkih materijala imaju prednosti poput definiranog kemijskog sastava i podesivih mehaničkih svojstava koja dokazano utječu na diferencijaciju stanica i staničnu adheziju. Sintetski materijali koji se koriste kao biomaterijali su polimeri poput polietilen glikola (PEG), polivinil alkohola, poli(mliječne-ko-glikolne kiseline) (PLGA) i poli (2-hidroksietil metakrilata) (PMMA) te materijali na bazi titana, bioaktivnog stakla ili pak samosastavljeni peptidi [19]. Mana sintetskih materijala je što pojedinim vrstama nedostaju mjesta za staničnu adheziju što dovodi do potrebe za premazom proteina iz ECM-a kako bi se oponašala niša u kojoj se stanice prirodno nalaze [19]. Uz navedene sintetske skele koriste se još hidrogelovi (engl. hydrogels) koji tvore manje krut sustav strukturne potpore za stanice, bestanični ECM (engl. decellularized ECM), materijali na bazi grafena te nanovlakna.

Hidrogelovi nastaju umrežavanjem polimernih lanaca. Kao i vrste prije navedenih nosača, hidrogelovi se mogu podijeliti na prirodne i sintetske, ali i polusintetske polimere. Prirodni hidrogelovi uključuju celulozu, hitozan, kolagen, alginat, agarozu, hijaluronsku kiselinu, želatinu i fibrin. Odlikuje ih inherentna biokompatibilnost, bioaktivnost i biorazgradivost, ali i

relativno slaba stabilnost i mehanička čvrstoća [21]. Sintetski hidrogelovi sačinjeni su od sintetskih polimera poput polivinil alkohola (PVA), polietilen glikola (PEG), polietilen oksida (PEO), poliakrilamida (PAAM), polihidroksietilmetakrilata (PHEMA) i brojnih drugih. Zbog svoje sposobnosti da simuliraju većinu tkiva, hidrogelovi atraktivan su materijal za razvoj sintetičkih struktura nalik ECM-u. Vrline ovih mrežastih struktura polimera su visoki sadržaj vode, jednostavan transport kisika, hranjivih tvari i otpada kao i realan transport topivih faktora [22].

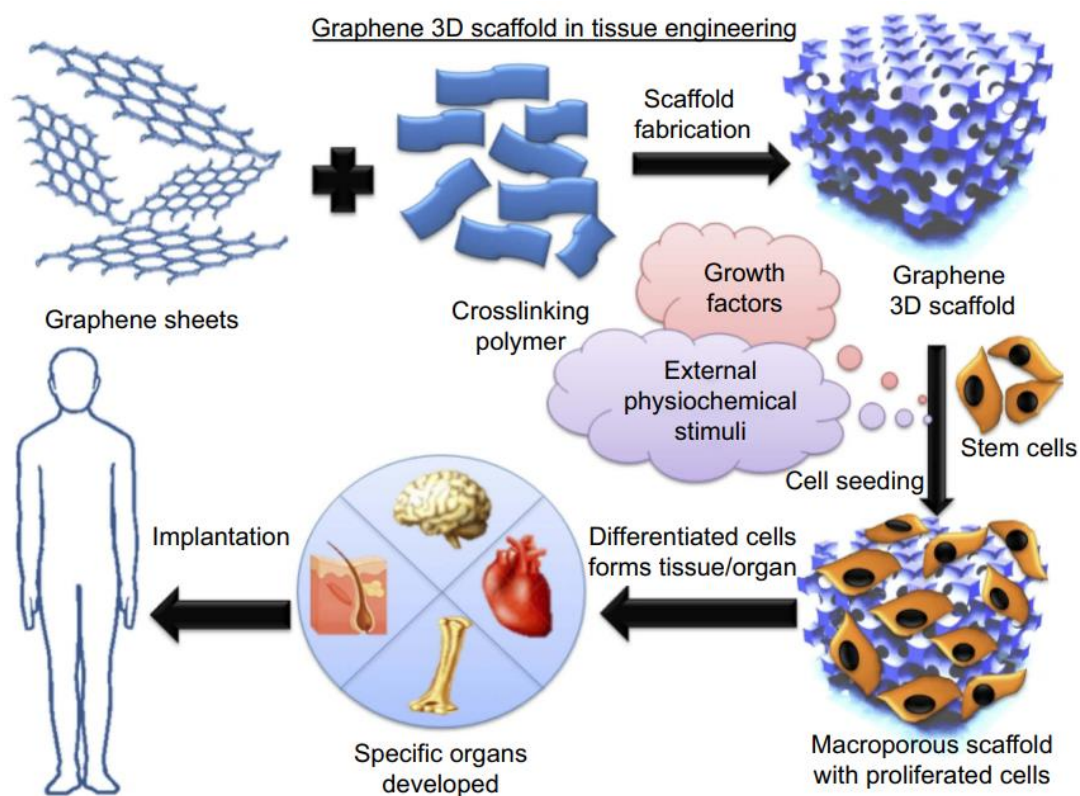
Kako je glavni fokus 3D staničnih kultura oponašanje prirodne konformacije tkiva *in vitro*, bezstanični uzorci ECM-a imaju jako veliki potencijal kao idealan supstrat za stvaranje biomimetičke niše. Bezstaničnom matricom jednostavnije je rekreirati prirodnu geometrijsku morfologiju tkiva, njihovu fleksibilnost i mehaničku čvrstoću, što je teže oponašati uz pomoć sintetičkih nosača. Unatoč naoko idealnim uvjetima koje pruža ova vrsta nosača za kulturu, bezstanični matriks teško je generirati za delikatna tkiva kao što je to primjerice neuralno tkivo. Sam proces decelularizacije odnosi se na proces tretiranja pojedinog tkiva bilo kojom kombinacijom fizičkog stresa i enzimskih sredstava za uklanjanje staničnih komponenti, ostavljajući samo bezstanični ECM koji se koristi u bioinženjeringu [23].



Slika 3. Prikaz relevantnih biomaterijala i metoda pripremanja 3D staničnih kultura. (A) hidrogel, (B) čvrsta struktura/ čvrsti scaffold, (C) bezstanično tkivo; uz pomoć navedenih biomaterijala moguće je „zarobiti“ stanice unutar trodimenzionalne strukture te ih kultivirati *in vitro* u okruženju sličnom staničnom mikrookolišu *in vivo* ; Slika preuzeta iz: Park Y, Huh KM, Kang SW. Applications of Biomaterials in 3D Cell Culture and Contributions of 3D Cell Culture to Drug Development and Basic Biomedical Research. Int J Mol Sci. 2021 Mar 2;22(5):2491. doi: 10.3390/ijms22052491. PMID: 33801273; PMCID: PMC7958286.

Grafen također predstavlja atraktivan izbor biomaterijala za izradu nosača u staničnim kulturama i bioinženjeringu tkiva. Tanak, dvodimenzionalan, debeo samo jedan atom ugljika, ovaj biomaterijal zbog svoje jedinstvene strukture ima mnoga jedinstvena svojstva zbog kojih se sve češće koristi u tkivnom inženjeringu živčanog sustava. Osim što ima veliku čvrstoću, fleksibilnost, električnu vodljivost i antibakterijski učinak, grafen ima i sposobnost prodiranja kroz BBB [24]. Odlikuje se i visokim stupnjem

biokompatibilnosti zbog čega se lako može modificirati kako bi uvjeti *in vitro* kulture što više nalikovali uvjetima *in vivo*. Mogu se modificirati primjerice broj i veličine pora u koje se nastanjuju stanice, kao i hidrofilna svojstva, čineći grafen prikladnim materijalom za diferencijaciju u svim staničnim linijama. Upravo zbog svoje biokompatibilnosti ovaj biomaterijal sve češće je u uporabi pri kreiranju 3D staničnih modela te u regenerativnoj medicini kao svojevrsan nosač u regeneraciji tkiva (Slika 4.).



Slika 4. Shematski dijagram korištenja grafena kao strukturnog nosača u inženjeringu tkiva; Nakon formacije polimerne strukture, odabrane vrste matičnih stanica, ovisno o željenom tkivu koje se formira, usađuju se u poroznu strukturu grafena te se uz pomoć faktora rasta i vanjskih kemijskih stimulansa potiče diferencijacija stanica u čitava tkiva; Slika preuzeta iz: Geetha Bai R, Muthoosamy K, Manickam S, Hilal-Alnaqbi A. Graphene-based 3D scaffolds in tissue engineering: fabrication, applications, and future scope in liver tissue engineering. Int J Nanomedicine. 2019;14:5753–83.

4.2. Trodimenzionalni stanični modeli središnjeg živčanog sustava

Za potrebe istraživanja neurodegenerativnih poremećaja i općenito poremećaja na neurološkoj bazi, već nekoliko desetljeća aktivno se koriste 3D stanični modeli bazirani na ljudskim ili životinjskim stanicama. 3D stanični modeli SŽS-a općenito se odnose na strukture kultivirane *in vitro*, generirane iz pluripotentnih matičnih stanica ili somatskih matičnih stanica izdvojenih iz zdravih pojedinaca ili pak pacijenata oboljelih od neurodegenerativnih bolesti [25]. Sastavljanje ovih modela u laboratorijskim uvjetima označava formiranje neuralnih tkiva koja konstituiraju modelni sustav sa objedinjenim važnim karakteristikama SŽS-a. Navedeni modelni sustavi koriste se potom za istraživanje neurorazvoja, prikazivanje patofiziologije, ubrzavanje otkrivanja lijekova te u svrhe poboljšanja regeneracije tkiva [26].

Izrada 3D staničnih modela rezultirala je sve jednostavnijim modeliranjem bolesti i posljedično dovela do pojednostavljivanja procesa laboratorijskih i kliničkih ispitivanja potencijalnih terapija ispitivanih na 2D staničnim modelima. Kao što je to prethodno već navedeno, 2D tipu staničnih modela nedostaje upravo treća dimenzija koja uvelike diktira odvijanje bioloških procesa u stanicama. Kada je riječ o staničnim modelima korištenima za ispitivanje bolesti poput AB, PB, HB, amiotrofične lateralne skleroze ili pak demencije, fokus je na stanicama SŽS te se nastoji kreirati stanični okoliš koji će omogućiti njihovo ponašanje *in vitro* što sličnije ponašanju *in vivo*. Omogućavanje takvih uvjeta podrazumijeva stvaranje staničnog okoliša u kojem se stanice nalaze tijekom neurogeneze, odnosno gliogeneze prilikom kojih se matične stanice i stanice neuralnih progenitora diferenciraju u neurone i glija stanice.

Modeliranje SŽS-a zahtijeva razumijevanje njegovih osnovnih odnosa strukture i funkcije na više razina. U širem kontekstu, SŽS predstavlja skup heterogenih tkiva unutar kostiju lubanje i kralježnice te njihove koordinirane aktivnosti koje omogućuju osjet, percepciju, pamćenje i voljno kretanje. Specijalizirana funkcija svake neuralne regije određena je njenom

staničnom arhitekturom koja je definirana tipom stanica, neuralnim mikrookruženjem kao i konfiguracijom veza koje ga povezuju s ostalim regijama unutar i izvan SŽS-a [26]. U užem smislu, SŽS je sastavljen od različitih vrsta stanica poput neurona, oligodendrocita, ependimalnih stanica, astrocita i mikroglia koje su u međusobnoj interakciji. Neuronima su električki ekscitabilne stanice specijalizirane za brzu komunikaciju između stanica i zaslužne za sintezu neurotransmitora i neuropeptida odnosno prijenosnika informacija unutar složenih mreža. Oligodendrociti, stanice su koje stupaju u interakciju sa neuronima kako bi formirali izolacijsku mijelinsku ovojnicu duž aksona i time povećali stopu signalizacije. Ependimalne stanice zaslužne su za proizvodnju cerebrospinalnog likvora, čišćenje otpadnih tvari i ublažavanje mehaničkih ozljeda dok astrociti reguliraju sinaptičku aktivnost, metabolizam glukoze, lipida, vode, iona uz brojne ostale funkcije. Glija stanice održavaju homeostazu, potpora su neuronima, a njihova specifična podskupina poput mikroglia ima imunološke funkcije. Navedene stanice SŽS-a kooperativno funkcioniraju unutar kompleksnog mikrookruženja izvanstaničnog matriksa. ECM je bogat proteoglikanima koji stabilizira vezu između stanica unutar neuronskih mreža [26].

Inovacije u biologiji matičnih stanica i inženjerstvu neuralnog odnosno živčanog tkiva omogućile su bioinženjering prilagodljivih 3D modela SŽS-a. Nedugo nakon razvoja prvih tehnika za vizualizaciju mikroskopske anatomije mozga, razvijeni su i osnovni koloidni hidrogelovi. Zahvaljujući tomu tkiva SŽS-a po prvi put kultivirana iz stanica embrija žabe koristeći tzv. tehniku viseće kapi (engl. hanging drop technique). Otkriće multipotentnih matičnih stanica omogućilo je dizajniranje i kontroliranje umjetno sintetiziranih tkiva pomoću hidrogelova utemeljenih na mreži polimera koji služe kao sustav potpore. Bioinženjering tkiva nažalost ima i svoje mane poput činjenice da tkivima sintetiziranim u laboratorijskim uvjetima nedostaju autohtone karakteristike SŽS-a te stoga ne mogu vjerodostojno i u potpunosti prikazati složene stanične interakcije.

Bioinženjering modela središnjeg živčanog sustava iziskuje obuhvaćanje glavnih karakteristika tkiva *in vivo* zbog čega je nužan pouzdan i promišljen izbor stanica i materijala za sustav strukturne potpore.

Izbor stanica predstavlja jedan od najesencijalnijih čimbenika pri izradi staničnih modela, stoga se stanice biraju prema vrsti istraživanja koje se provodi. Životinjske stanice SŽS-a koje se koriste kultiviraju se iz embrionalnih, perinatalnih i odraslih jedinki. Za potrebe istraživanja ljudske fiziologije i mehanizama bolesti živčanog sustava, sve češće se koriste prethodno navedene ljudske embrionalne matične stanice, inducirane pluripotentne stanice i neuralne matične stanice. Ove vrste stanica mogu se diferencirati duž specifičnih neuralnih linija, stvarajući pritom programirane neuronske populacije sa specifičnim neurotransmiterima i neuropeptidima, kao i astrocite, mikroglije i oligodendrocite. Stanice izdvojene iz pacijenata također se mogu kultivirati i reprogramirati u pojedine stanice SŽS-a kako bi se stvorio personalizirani model SŽS-a s genetskim materijalom pojedinca. Navedeni personalizirani modeli koriste se potom za simuliranje jedinstvenog fenotipa bolesti kako bi se izvršio visokoučinkovit probir lijekova i spriječila otpornost na liječenje.

Zrelost stanica također je bitan faktor pri izradi modela, jer plastičnost, regenerativni potencijal i genska ekspresija ovise o razvojnom stupnju stanica. Neurorazvojni poremećaji će se stoga ispitivati na EMS-u bogatim neuralnim progenitorima, za razliku od neurodegenerativnih bolesti za koje se mogu koristiti stanice odraslih jedinki koje su manje plastične i više specijalizirane. Zrelost kultiviranog tkiva se može modificirati neovisno o izvoru korištenih stanica na način da se izmijene mehanička svojstva strukturnih nosača unutar modela. Promjene unutar umjetno kreiranog ECM-a stoga oponašaju prirodan proces starenja ili pak starenje uzrokovano bolešću.

Prije navedene činjenice opisuju kao važan element i vrstu materijala koji se koriste pri izradi strukturalnih potpora stanicama u modelima.

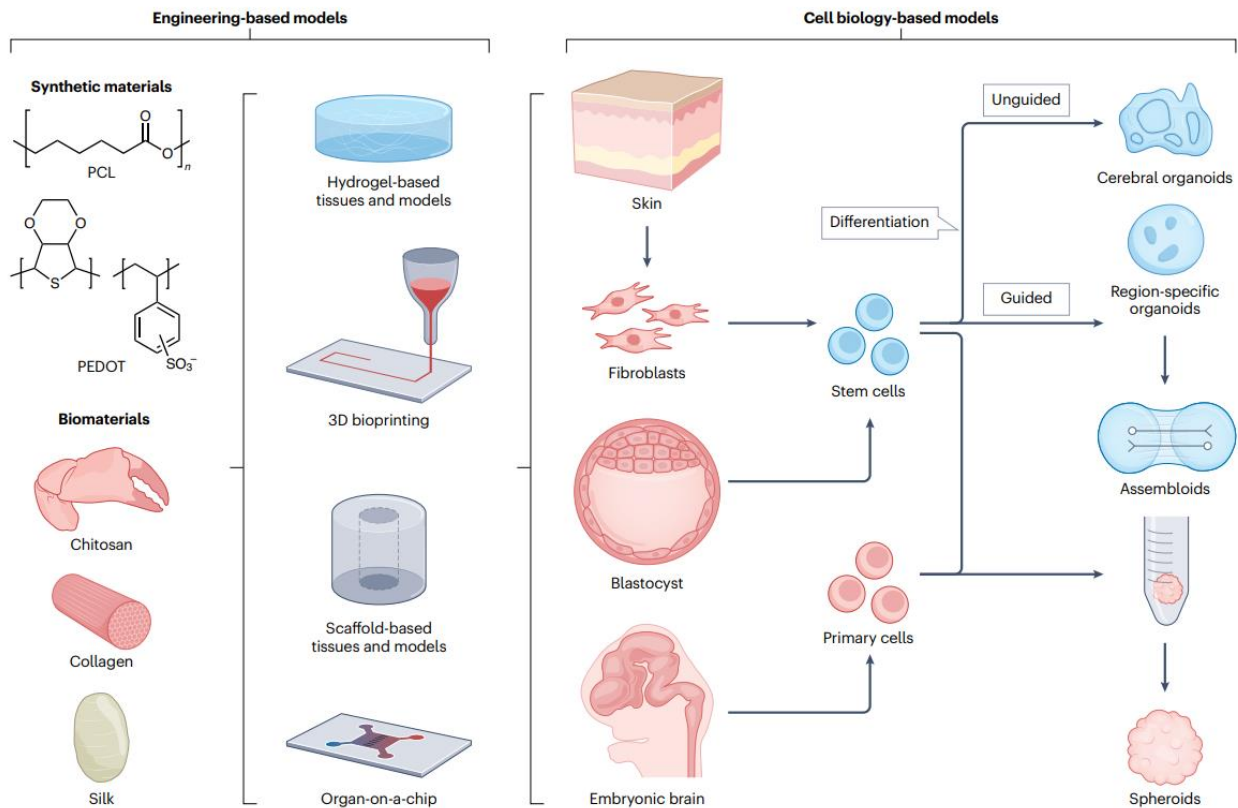
Modeli nužno moraju rekreirati jedinstveni stanični mikrookoliš SŽS-a. To iziskuje korištenje materijala sa Youngov-im modulom elastičnosti sličnim organima čija tkiva se laboratorijski kreiraju kako bi se što efektivnije oponašali biološki procesi *in vivo*. Na materijalima s Youngovim modulom ≤ 10 Pa inhibirani su i proliferacija i diferencijacija stoga je nužan viši modul kako bi se potakla i omogućila proliferacija neurona i glija stanica.

Funkcionalni modeli SŽS-a mogu se kategorizirati na modele bazirane na bioinženjeringu tkiva i modele bazirane na biologiji stanica ovisno o načinu izrade te materijalima koji se koriste kao njihove podloge i potpore. Kao što je to slučaj i kod ostalih vrsta 3D staničnih modela, materijali koji se koriste pri izradi modela SŽS-a dijele se na hidrogelove, strukturne nosače unutar sintetske stanične matrice, biomaterijale i sintetske materijale (Slika 5).

Biomaterijali koji se koriste za navedene funkcionalne modele su kolagen, prisutan u gotovo svim vezivnim tkivima, koji se kombinira s hijaluronom kako bi se potaknuo rast neurita te proliferacija i diferencijacija neuralnih progenitora u stanicama modela. Koriste se još i hitozan, koji potiče adheziju živčanih stanica, rast neurita i regeneraciju SŽS-a te svilin fibroin kao biorazgradivi materijal koji uz hidrogelove omogućuje izradu modela slične tvrdoće kao tkiva SŽS-a.

Polimerne sintetske mreže unutar skela oplemenjuju se biomaterijalima kako bi potaknuli normalno provođenje staničnog rasta, proliferacije i organizacije tkiva unutar modela. Sintetske materijale jednostavnije je doraditi. Model tada poprima određena svojstva, primjerice poboljšanje stanične signalizacije i regeneracije zahvaljujući piezoelektričnim svojstvima materijala. Također je moguće i pospješiti električnu vodljivost stanica. Neki od često korištenih polimernih materijala za izradu modela živčanog sustava su poli-3,4-etilendioksitiofen (PEDOT), polietilen- glikol (PEG), polikaprolakton (PCL) te polimljična kiselina (PLA). PEDOT je primjer sintetskog materijala koji kod modela SŽS-a stimulira sintetizirana

tkiva galvanotaksijom potičući diferencijaciju matičnih stanica i rast aksona [26].



Slika 5. Prikaz funkcionalnih 3D modela SŽS-a baziranih na bioinženjeringu tkiva; Modeli bazirani na inženjeringu kombiniraju materijali i stanice kako bi se kreirali biomimetsko tkivo SŽS-a. Sintetski materijali (poput polikaprolaktona (PCL), poli(3,4-etilendioksitiofen)(PEDOT)), biomaterijali (kao što su hitozan, kolagen i svila) ili kombinacija navedenih materijala koriste se za izradu lako modificirajućih hidrogelova, 3D „tinte“, „skela“ te tzv. organa na čipu. Navedeni 3D modeli iziskuju precizno dizajniranje koje uključuju modifikaciju na mikro- i makro- razini u svrhu sprječavanja nastanka aberacijskih tkiva na fiziološkoj razini. Modeli zasnovani na principima stanične biologije autentičnije predstavljaju staničnu strukturu i 3D mikrookoliš. Samoorganizirajući organoidi, njihove kombinacije te sferoidi kultivirani su iz iPMS i embrionalnih tkiva ne zahtijevaju potporne materijale zbog čega vjerodostojnije prikazuju tkiva živčanog sustava. ;Slika preuzeta iz: Rouleau N, Murugan NJ, Kaplan DL. Functional bioengineered models of the central nervous system. Nat Rev Bioeng. 2023;1(4):252–70.

4.2.1. Organodi i sferoidi

3D modeli utemeljeni na staničnoj biologiji stvaraju se zahvaljujući staničnim autonomnim procesima, što rezultira samoorganizacijom tkiva složene arhitekture u sferoide i organoide.

U kontekstu SŽS-a, organoidi su trodimenzionalni agregati neuralnih stanica kultivirani u laboratorijskim uvjetima. Neuralni organoidi formiraju se procesom stanične samoorganizacije uz pomoć topivih faktora i mikrokolišnih čimbenika kultivacijske sredine. Stvaranje ovih modela u laboratorijskim uvjetima izvršava se na način da se agregati, odnosno složena cjelina sastavljena od EMS-a ili iPMS-a, ugrađuju u dezintegriranu prirodnu strukturu bogatu komponentama izvanstanične matrice poput laminina i kolagena. Razvrstavanje stanica i oblikovanje tkiva nakon postavljanja na podlogu napreduje prema morfologiji modela koji je veličine od 0,5 do 4,0 milimetra sa značajkama središnjeg živčanog sustava starosti ovisnoj o odabiru ishodnih stanica. Organoid se razvija tijekom nekoliko tjedana, prikazujući različite vrste i arhitekturu živčanih stanica. Predstavljaju iznimno koristan alat za ispitivanja SŽS-a, jer je moguće kreirati tkiva bilo kojeg dijela živčanog sustava poput moždane kore i ostalih regija mozga te kralježnične moždine. Razvoj i neuronska aktivnost organoida ispituju se bojanjem neurona u nastalom staničnom agregatu, analizom genske ekspresije i funkcionalnim testiranjem [27]. Organoidi su do sada najčešće korišteni u svrhe kreiranja pojedinih regija mozga ili cijelog organa pri istraživanjima neurorazvoja ili neurodegenerativnih bolesti. Zahvaljujući razvitku ove metode stanične kulture u laboratorijskim uvjetima moguće je formirati cerebralne organoide koji mogu oponašati razvoj SŽS-a.

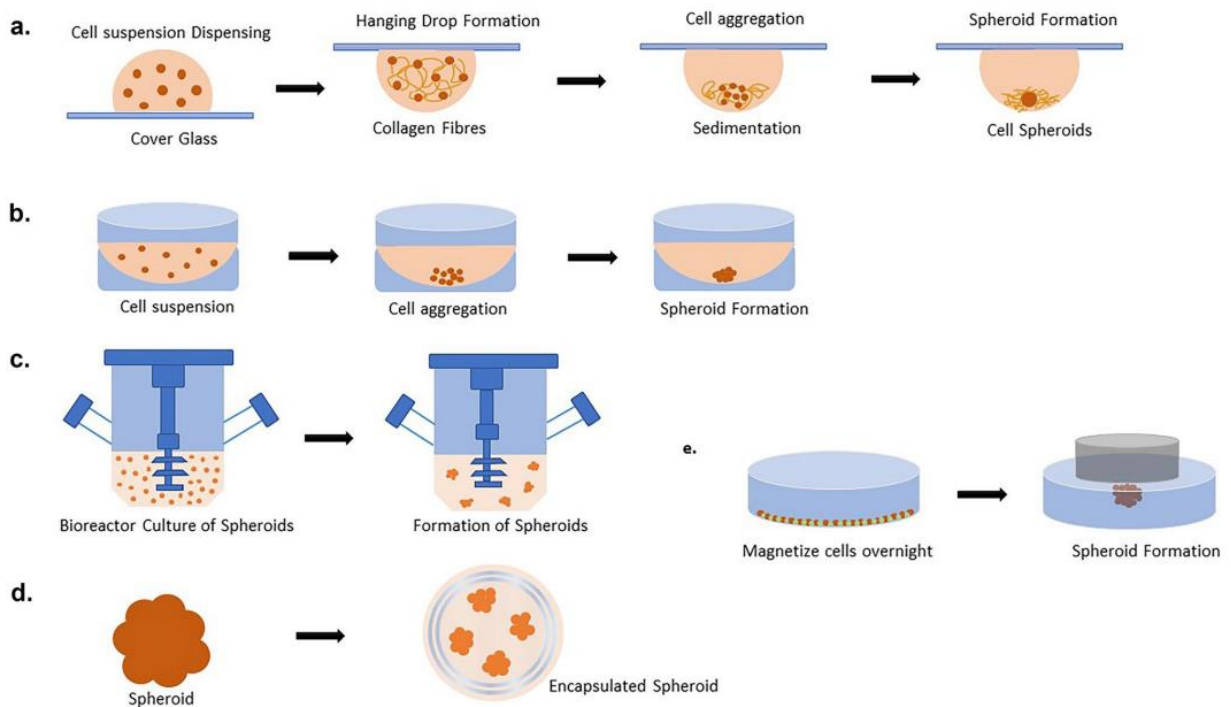
Sferoidi, odnosno u kontekstu istraživanja SŽS-a, neurosferoidi, stanični su agregati formirani u okruženju koje sprječava pričvršćivanje zbog membranskih proteina (integrina) i proteina izvanstaničnog matriksa. Sačinjeni su od grupiranih stanica embrionalnih tkiva, besmrtnih staničnih linija ili matičnih stanica. Kultiviraju se u uvjetima bez prianjajuće površine

zbog čega su stanice prisiljene centrifugiranjem ili gravitacijom vezati se jedna na drugu. Proces nastanka sferoida može se svesti na nekoliko koraka: prvi korak obuhvaća nakupljanje stanica preko vlakana ECM-a koje sadrže specifičan niz aminokiselina (tzv. RGD), taj proces potom pojačava ekspresiju proteina kadherina koji se nakuplja na staničnim membranama i krajnje veže susjedne stanice tvoreći sferoide [28].

Neurosferoidi uspostavljaju svoj vlastiti 3D mikrookoliš izlučivanjem izvanstanične matrice. Ova vrsta staničnog modela stoga ne iziskuje vanjski sustav potpore staničnoj strukturi. Njihova unutarnja struktura manje nalikuje na strukturu pojedinih neuralnih tkiva *in vivo* za razliku od organoida koji realističnije prezentiraju tkivnu arhitekturu. Za mehaničku cjelovitost i razvoj sferoida bitni su proteini citoskeleta poput aktina. Veličinom su manji od jednog milimetra u promjeru, no posjeduju stupanj stanične gustoće podosta sličan *in vivo* tkivima SŽS-a. Obzirom na jednostavnost kojom se odlikuju, neurosferoidi mogu se spojiti u veće, agregate koji tada autentičnije prikazuju funkcionalne neuronske mreže.

Nekoliko metoda se koristi za izradu neurosferoida u laboratorijskim uvjetima (Slika 6). Metoda tzv. viseće kapi koristi se za stvaranje staničnih kultura bez strukturnih nosača poput neurosferoida. Uključuje stavljanje kapljica stanične suspenzije na poklopac ili specijaliziranu ploču kako bi se stvorila viseća kapljica koju na mjestu drži površinska napetost. Neadhezivni agarozni hidrogelovi također se koriste u metodama uzgoja sferoida i imaju prednosti kao što su jednostavno održavanje, precizna kontrola veličine i proizvodnja mikrotkiva visokog prinosa. Adheziju između stanica potiče neljepljivi supstrat jer se stanice nasađuju na hidrogel s udubljenjima gdje se same okupljaju u sferoidna mikrotkiva. Ostale tehnike predstavljaju jedinstvene načine za generiranje neurosferoida uključuju magnetsku „levitaciju“, dodavanje nanovlakana u staničnu otopinu te stanične kulture rotacijskog sustava. S modifikacijama poput rotirajućih tikvica, veći sferoid može se formirati tehnikom sustava rotacijskih kultura (engl. rotary cell cultures – RCC) koja obuhvaća agregaciju i

samoosastavljanje stanica u okruženju bez supstrata. Metoda magnetske „levitacije“ koristi paramagnetske nanočestice za konstruiranje 3D staničnih kultura, dok nanovlakna poboljšavaju razvoj sferoida i smanjuju broj odumrlih stanica zbog neprianjanja na površinu. Koristeći magnetske sile, magnetska levitacija može brzo uvući stanice u kulturi u sferoidne strukture.



Slika 6. Slikoviti prikaz metoda oblikovanja višestaničnog sferoida: (a) metoda viseće kapi, (b) stanična kultura u suspenziji, (c) bioreaktorski sustavi, (d) svojevrsna inkapsulacija sferoida u kultivacijskom mediju, (e) magnetska levitacija; slika preuzeta iz Biju TS, Priya VV, Francis AP. Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostics: an updated review. Drug Deliv Transl Res. 2023;13(9):2239–53.

4.2.2. 3D bioprintani modeli

Bioprintanje (engl. bioprinting) metoda je koja se odnosi na 3D printanje biološki inertnih materijala ili biomaterijala koji sadrže stanice i biološke tvari. Oslanja se na urođene organizacijske karakteristike stanica i tkiva zbog čega je kao metoda izuzetno zastupljena u regenerativnoj medicini i

kreiranju *in vitro* modela. Bioprintani modeli SŽS-a kombiniraju materijale i stanice kako bi formirali 3D strukture tkiva s prostornom preciznošću od jedne stanice. Ključni parametri u 3D bioprintanju živčanog tkiva uključuju pažljiv odabir i karakterizaciju hidrogelne biotinte koja se koristi za stvaranje funkcionalnih tkiva [29]. Ovi parametri uvelike utječu na ponašanje i funkcionalnost tkiva. Osim toga, električna vodljivost ključna je za oponašanje neuronskih mreža i podržavanje regeneracije aksona. Hidrogelovi s lošim električnim svojstvima mogu se poboljšati vodljivim dodacima poput polimera za poboljšanje električnih svojstava i promicanje neuralne diferencijacije.

U tzv. direktnom bioprintanju, stanice su prožete hidrogelovima s ciljem stvaranja biotinte koja se može „ispisivati“ kao kontinuirani filamenti ili koristiti pri sastavljanju laserom potpomognutih kompleksnih 3D tkivnih struktura [26]. Biotinta predstavlja tekući materijal u čijem sastavu su žive stanice. Ispravno podešena viskoznost i reološka svojstva biotinte ključni su čimbenici. Krutost biotinte mora biti približna čvrstoći prirodnog tkiva kaok bi izazvala odgovorajuće stanične reakcije. Uključivanje modifikacije i faktora rasta specifičnih za tkivo u biotintu može poboljšati funkcionalnost tkiva, podržavajući stanični rast, diferencijaciju i organizaciju.

Materijali za ispis uključuju alginat, kolagen, hitozan, želatinu, fibroin svile i polietilen glikol diakrilat (PEGDA) koji se mogu prethodno ispreplesti katalizatorima za brže geliranje [26]. Stanice embrionalnih tkiva, besmrtnne linije, matične stanice ili kombinacije navedenih mogu se ukomponirati u biotinte kako bi se prilagodila svojstva modelu sustava. Karakteristike koje se time mogu modificirati uključuju plastičnost samog modela te regenerativnu sposobnost. Biokompatibilnost i bioaktivnost bitna su razmatranja koja je potrebno uzeti u obzir pri bioprintanju. Usmjerena su na stvaranje okruženja kompatibilnog sa staničnim aktivnostima kao što su stabilnost stanica, migracija i proliferacija [29].

Kreiranje tkiva SŽS-a metodom bioprintanja trenutno je ograničeno manjkom svojstava poput viskoznosti i niže gustoće stanica u odnosu na

izvorna tkiva. Iako postoje ograničenja ove metode koja tek treba razriješiti, tehnologija bioprintanja nudi priliku za razvoj visoko kontroliranih oponašanja živčanog tkiva specifičnih za pacijente s potencijalom za kliničku primjenu.

4.2.3. Organi na čipu

Organ na čipu (engl. organ-on-a-chip) je biomimetički sustav koji predstavlja fiziološki organ izgrađen na mikofluidnom čipu. Stimulira strukturne i funkcionalne značajke ljudskog tkiva pritom predviđajući različite podražaje kao što su odgovori na lijekove i ostale okolišne utjecaje. Modeli SŽS-a na čipu temeljeni su na mikrofluidici i stavljaju fokus na najbitnije značajke fizioloških procesa multivarijantnih neuralnih sustava. Unatoč manjoj kompleksnosti, modeli SŽS-a koji se temelje na mikrofluidima dopuštaju uključivanje biofizičkih i kemijskih signalnih gradijenata za oponašanje mikrokolišnih znakova, protoka intersticijske tekućine i vođenje neurita razlučivosti jedne stanice. Ovi modeli sastoje se od mikrokanala, komora i funkcionaliziranih mikrodomena. Kroz njih teku tekućine poput medija za kulturu stanica ili nadomjestaka za krv kako bi simulirali cirkulaciju i interakcije unutar organa *in vivo*. Modeli organa na čipu također pružaju preciznu kontrolu nad čimbenicima kao što su razina kisika i smično naprezanje, omogućujući znanstvenicima što ispravniju simulaciju fizioloških uvjeta.

Raspored čipa dizajniran je korištenjem softvera za računalno potpomognuto projektiranje (engl. computer-aided design – CAD), uzimajući pritom u obzir željeni prostorni raspored stanica, mikrokanala i komora. Za izradu fizičkog čipa, odnosno organa na čipu, najčešće se koriste tehnike poput 3D bioprintanja, fotolitografije ili mikrokontaktni tisak [30]. Postupci litografije obuhvaćaju lijevanje polimera poput PDMS-a u prethodno kreiran kalup čime se formira bazalna matrica za kultivaciju stanica. Pri izradi organa SŽS-a na čipu koriste se NMS i iPMS koje se dalje diferenciraju u neurone, astrocite ili mikroglije i kultiviraju na površini

sintetskog čipa. Kao i kod prethodno navedenih 3D staničnih modela, bitno svojstvo organa na čipu jest stvoriti uvjete koji oponašaju ECM.

U posljednjem desetljeću, u formi organa na čipu uspješno su kreirani modeli krvno-moždane barijere, neuralne mreže, modeli za istraživanje neurodegenerativnih bolesti kao i modeli za ispitivanje neuroinflamacije [30].

4.2.4. Nedostaci trodimenzionalnih staničnih modela SŽS-a

Biotehnološki napreci u posljednjih nekoliko desetljeća omogućili su razvoj laboratorijskih metoda modeliranja stanica i tkiva koji sve uspješnije ocrtavaju karakteristike središnjeg živčanog sustava. Nažalost, unatoč velikim naporima znanstvenika modeli do sada kreirani suočeni su sa nizom nedostataka.

Jedan od najvećih izazova metode trodimenzionalnog modeliranja staničnih kultura predstavlja upravo nepoznat i složen proces kultivacije stanica u 3D prostoru. Stanice sadržane u središnjem živčanom sustavu izuzetno su osjetljive prirode stoga je nužno stvoriti optimalne uvjete za njihovu stabilnost potom diferencijaciju i proliferaciju.

Vrste stanica koje se koriste pri izradi modela podižu etičke dvojbe neovisno jesu li životinjskog ili ljudskog podrijetla. Koriste se stanice embrionalnih tkiva i neuralnih linija zdravih pojedinaca ili pak oboljelih pacijenata pri čemu etične dvojbe potiču metode uzorkovanja bioloških materijala. Nužno je ispravnije postaviti granicu manipulacije biološkim materijalom bez obzira radi li se o uzorcima životinjskih ili ljudskih stanica [31].

Svaki od navedenih tipova 3D modela suočen je sa svojevrsnim manjkavostima no univerzalan problem koji se javlja je nedostatak vaskularizacije posebice u modelima poput sferoida i organoida. Vaskularizacija je nužna kako bi se osigurao dostatan dotok kisika i omogućila pravilna eliminacija štetnih tvari stoga je potrebno sintetski nadomjestiti krvožilni sustav.

Organoidi i sferoidi ograničeni su činjenicom da nisu sve stanice korištene u svrhe njihove izrade sposobne oponašati strukturu i funkciju umjetno generiranog organa. Nailaze na probleme uniformnosti i jednostavnosti strukture kao i zrelosti stanica koje se koriste. Diferencirani neuroni i glije ne uspijevaju postići stupanj zrelosti potreban za ispravnu gensku ekspresiju u zrelim stanicama [28].

U modelima baziranim na nosačima nedostaci uključuju varijabilnost od modela do modela i složenu prirodu njihovog sastava što otežava točno identificiranje signala koji potiču pojedine funkcije stanice. Prirodni gelovi korišteni u ulozi svojevrsni skela manje su poželjni zbog niske svestranosti i stupnja manipulacije.

Organima na čipu kao i 3D biopritanim modelima, također nedostaje aspekt vaskularizacije, ali i bolja prilagodba na testove probira visoke propusnosti (engl. high-throughput screening – HTS). 3D bioprintani modeli nedostatni su ujedno i u očuvanju zrelosti i funkcionalnosti tkiva.

5. Primjena 3D staničnih modela SŽS-a

Svestranost 3D staničnih modela omogućila je brojna otkrića u posljednjih nekoliko desetljeća. Kreiranje staničnih modela i tkiva uz treću dimenziju stvorilo je priliku za dublje prodiranje unutar bioloških procesa stanica središnjeg živčanog sustava. Napredak u ovom dijelu tkivnog inženjerstva doprinio je otkrićima u području istraživanja mehanizama neurodegenerativnih i neuroloških bolesti čija patogeneza i dalje nije sasvim razjašnjena. Ta činjenica otežava razvoj potencijalnih farmakoterapija za navedene bolesti, no upravo zahvaljujući 3D staničnim modelima moguće je zakoračiti u složenost procesa razvitka pojedine bolesti. 3D stanični modeli postupno su sve učestaliji i pri istraživanju raka poput glioblastoma ili retinoblastoma, jer se za razliku od često korištenih životinjskih ili 2D modela mogu jednostavnije modificirati za istraživanje potencijalnih genskih mutacija [32].

Kada su u pitanju neurodegenerativne bolesti, 3D stanični modeli izuzetno su uspješno ukomponirani u istraživanja AB, PB i HB. Prije korišteni jednoslojni stanični ili životinjski modeli nisu uspješno obuhvaćali karakteristike bolesti zbog nedostatka organizacije tkiva u mozgu. Lijekovi razvijeni na takvim modelima nisu se pokazali učinkovitim pri uporabi od strane oboljelih pojedinaca.

Segmenti SŽS-a koji su efikasno kreirani u *in vitro* uvjetima uključuju mozak i BBB, kralježničnu moždinu te retinu. Probir lijekova, modeliranje bolesti ili pak ispitivanje mehanizama koji potencijalno uzrokuju rak moguće je jednostavnije i preciznije izvršiti u kontroliranim uvjetima upravo uz pomoć 3D staničnih modela SŽS-a.

6. Zaključak

Manjkavosti životinjskih modela čiji rezultati ispitivanja se ne mogu u potpunosti preslikati na ljudski organizam te korištenje 2D modela s nedostatnim karakteristikama doveli su do potrebe za razvitkom alternativnih modela. 3D stanični modeli otvorili su vrata brojnim istraživanjima na području medicine, farmacije i biotehnologije kao modeli koji teže sveobuhvatno predstaviti dio izuzetno kompleksne cjeline koja jest ljudski organizam. Počevši od prikupljanja stanica SŽS-a za kultivaciju u optimalnim uvjetima, do osiguravanja primjerene podloge i okruženja za rast i razvoj stanica do samog nastanka kulture stanica ili pak tkiva, ova metoda iziskuje visoku preciznost i naprednu tehnologiju. Unatoč svojim nedostacima poput visokog troška proizvodnje ili pak nedostatnog obuhvaćanja međustaničnih odnosa, metoda izrade 3D staničnih modela i dalje je pouzdaniji izbor pri istraživanju ljudskog organizma od 2D modela. Daljnji razvoj ove metode proširuje horizonte znanstvenih istraživanja ostavljajući mjesto za napredak ka personaliziranoj medicini čiji individualni pristup liječenju nije pitanje budućnosti već pitanje vremena.

7. Literatura

- [1]. Sousa AMM, Meyer KA, Santpere G, Gulden FO, Sestan N. Evolution of the Human Nervous System Function, Structure, and Development. *Cell*. 2017 Jul 13;170(2):226-247. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.036. PMID: 28708995; PMCID: PMC5647789.
- [2]. World life expectancy 1950-2023 [Internet]. Macrotrends.net. Available from: <https://www.macrotrends.net/countries/WLD/world/life-expectancy>
- [3]. Klepac N, Clinical Hospital Centre Zagreb, University of Zagreb, School of Medicine, Referral Centre for Cognitive Neurology and Neurophysiology, Zagreb, Croatia. Neurological Changes in Longevity. *Soc Psihijatr*. 2019;47(3):351–8.
- [4]. Zheng JC, Chen S. Translational Neurodegeneration in the era of fast growing international brain research. *Transl Neurodegener*. 2022;11(1).
- [5]. Merryweather D, Roach P. *MRS Communication*. ;7 (3): 309 – 319. (2017)
- [6]. Centeno EGZ, Cimarosti H, Bithell A. 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Mol Neurodegener*. 2018;13(1):27.
- [7]. Kalra K, Tomar PC. *Stem Cell: Basics, Classification and Applications* [Internet]. Imedpub.com.
- [8]. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):68.
- [9]. Picerno A, Stasi A, Franzin R, Curci C, di Bari I, Gesualdo L, et al. Why stem/progenitor cells lose their regenerative potential. *World J Stem Cells*. 2021;13(11):1714–32.
- [10]. Logan S, Arzua T, Canfield SG, Seminary ER, Sison SL, Ebert AD, et al. Studying human neurological disorders using induced pluripotent stem

cells: From 2D monolayer to 3D organoid and blood brain barrier models. *Compr Physiol* [Internet]. 2019 9(2):565–611.

[11]. Llorente V, Velarde P, Desco M, Gómez-Gaviro MV. Current understanding of the neural stem cell niches. *Cells*. 2022;11(19):3002.

[12]. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(12):7634–8.

[13]. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145–7.

[14]. Cai C, Grabel L. Directing the differentiation of embryonic stem cells to neural stem cells. *Dev Dyn*. 2007;236(12):3255–66.

[15]. Liyang G, Abdullah S, Rosli R, Nordin N. Neural commitment of embryonic stem cells through the formation of embryoid bodies (EBs). *Malays J Med Sci*. 2014;21(5):8–16.

[16]. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.

[17]. Wu Y-C, Sonninen T-M, Peltonen S, Koistinaho J, Lehtonen Š. Blood-brain barrier and neurodegenerative diseases-modeling with iPSC-derived brain cells. *Int J Mol Sci*;22(14):7710.

[18]. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol*. 2011;21(12):745–54.

[19]. Biju TS, Priya VV, Francis AP. Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostics: an updated review. *Drug Deliv Transl Res*. 2023;13(9):2239–53.

- [20]. Knight E, Przyborski S. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created *in vitro*. *J Anat.* 2015;227(6):746–56.
- [21]. Ho T-C, Chang C-C, Chan H-P, Chung T-W, Shu C-W, Chuang K-P, et al. Hydrogels: Properties and applications in biomedicine. *Molecules.* 2022;27(9):2902.
- [22]. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng .* 2009;103(4):655–63.
- [23]. Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioeng Transl Med.* 2019;4(1):83–95.
- [24]. Ławkowska K, Pokrywczyńska M, Koper K, Kluth LA, Drewa T, Adamowicz J. Application of graphene in tissue engineering of the nervous system. *Int J Mol Sci.* 2021,23(1):33.
- [25]. Tang X-Y, Wu S, Wang D, Chu C, Hong Y, Tao M, et al. Human organoids in basic research and clinical applications. *Signal Transduct Target Ther.*2022;7(1):1–17.
- [26]. Rouleau N, Murugan NJ, Kaplan DL. Functional bioengineered models of the central nervous system. *Nat Rev Bioeng .* 2023;1(4):252–70.
- [27]. Zhao Z, Chen X, Dowbaj AM, Sljukic A, Bratlie K, Lin L, et al. Organoids. *Nat Rev Methods Primers.* 2022;2(1).
- [28]. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6225.
- [29]. Cadena M, Ning L, King A, Hwang B, Jin L, Serpooshan V, et al. 3D bioprinting of neural tissues. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(15):2001600.

[30]. Haring AP, Sontheimer H, Johnson BN. Microphysiological human brain and neural systems-on-a-chip: Potential alternatives to small animal models and emerging platforms for drug discovery and personalized medicine. *Stem Cell Rev.* 2017;13(3):381–406.

[31]. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2021. *The Emerging Field of Human Neural Organoids, Transplants, and Chimeras: Science, Ethics, and Governance*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/26078>.

[32]. Luo J, Li P. Human pluripotent stem cell-derived brain organoids as in vitro models for studying neural disorders and cancer. *Cell Biosci.* 2021;11(1).

8. Životopis



Nikolina Miščević

Datum rođenja: 28/09/2000 | **Državljanstvo:** hrvatsko | **Spol:** Žensko | **E-adresa:**

nikolina.miscevic5@gmail.com | **Adresa:** Ulica Antuna Branka Šimića, 21000 , Split, Hrvatska (Kućna)

● RADNO ISKUSTVO

2023 Rijeka, Hrvatska

POVJERENSTVO ODJELA ZA BIOTEHNOLOGIJU SVEUČILIŠTE U RIJECI

2022 Split

STRUČNA PRAKSA NASTAVNI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO SDŽ

Odjel za toksikologiju

● JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **HRVATSKI**

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLESKI	C2	C2	C2	C2	C2
NJEMAČKI	A2	A2	A2	A2	A2

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

● DIGITALNE VJEŠTINE

MS Office (Word Excel PowerPoint) | Vješto korištenje komunikacijskim programima (Skype, Zoom, TeamViewer) | molecular design software (PyMol, Avogadro, Marvin)

● OBRAZOVANJE I OSPOBLJAVANJE

2015 – 2019 Split

GIMNAZIJA V. gimnazija "Vladimir Nazor" Split

2019 – TRENUTAČNO Rijeka

BIOTEHNOLOGIJA I ISTRAŽIVANJE LIJEKOVA Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

● DODATNE INFORMACIJE

VOLONTIRANJE

2019 Sveučilište u Rijeci, Odjel za Biotehnologiju

Otvoreni dan odjela za biotehnologiju