

Modeli *in vitro* endokrine trebušne slinavke

In vitro models of the endocrine pancreas

Marko Milojević,^{1,2} Andraž Stožer,³ Uroš Maver^{1,2}

Izvleček

Želja po razvoju tkivnih nadomestkov, potrebe po preučevanju mehanizmov bolezni v kontroliranih pogojih, pomanjkljivosti živalskih modelov in etične omejitve so bile povod za razvoj področja naprednih modelov *in vitro*. Te definiramo kot alternativne eksperimentalne sisteme, ki z uporabo modernih tehnik tkivnega inženirstva in aditivne proizvodnje posnemajo strukturo in funkcionalnost tkiv ali organov *in vitro*. Enostavni modeli *in vitro* se že uporabljajo v številne namene, vendar zaradi mnogih pomanjkljivosti ne posnemajo dovolj dinamičnih odzivov izvornih tkiv. Za izgradnjo funkcionalno kompleksnejših modelov *in vitro* je celice potrebno gojiti v tridimenzionalnem (3D) okolju ali bioloških nosilcih. Splošno morajo biološki nosilci posnemati mikroarhitekturo, hierarhično strukturo, fizikalne lastnosti in sestavo izvornega tkiva. Toda napredek k izgradnji kompleksnejših modelov omejuje predvsem difuzija plinov in hranil v notranjost konstrukta. Tehnika 3D tiska je trenutno najobetavnejša rešitev za proizvodnjo naprednih bioloških nosilcev, ki odpravljajo te pomanjkljivosti. 3D tisk poleg zmožnosti sočasne uporabe več biološko kompatibilnih materialov omogoča nalaganje materiala z mikrometrsko prostorsko ločljivostjo pri pogojih, primernih celicam. Vse od zasnove področja modelov *in vitro* je zaradi želje po preučevanju nastanka sladkorne bolezni razvoj funkcionalnega modela trebušne slinavke eden od osrednjih, a še nedoseženih ciljev. Zlati standard za bazične in translacijske raziskave trebušne slinavke pa je kljub nekaterim pomanjkljivostim metoda tkivne rezine, medtem ko trenutni najnaprednejši 3D zgrajeni modeli trebušne slinavke *in vitro* posnemajo le osnovne funkcije organa. Namen tega članka je predstavitev modelov *in vitro* s poudarkom na modelih trebušne slinavke. Predstavil bo tipe modelov in ključne elemente, ki jih je treba pri izgradnji upoštevati. Poudarek bo na kompleksnejših 3D zgrajenih modelih *in vitro* in tkivnih rezinah, materialnih lastnostih bioloških nosilcev ter tehniki 3D tiska za izgradnjo naprednih bioloških nosilcev. Menimo, da je sočasni razvoj znanosti o materialih, mikroproizvodni tehnologiji in celičnih kulturah izjemno obetavna pot k izgradnji funkcionalnega modela trebušne slinavke *in vitro*.

Abstract

Ambitions to develop artificial tissue substitutes, combined with the need to study underlying mechanisms of disease under controlled conditions, shortcomings of animal models, as well as ethical constraints were the main driving forces behind the development of advanced *in vitro* models. These are defined as alternative experimental systems made by leveraging recent advances in tissue engineering and additive manufacturing that mimic tissue or organ level physiology *in vitro*. Simple *in vitro* models are already being used in many applications, however due to their many drawbacks, they incompletely mimic dynamic responses of native tissues. In order to construct functionally more relevant *in vitro* models, cells need to be grown in three-dimensional (3D) environments or bioscaffolds. Generally, bioscaffolds must recapitulate the microarchitecture, hierarchical structure, physical properties, and composition of native tissues. Nonetheless, progress towards building more complex models is hindered primarily by the diffusion of gases and nutrients into the constructs' interior. Currently, 3D printing presents the most promising solution for the production of advanced bioscaffolds which resolve the above mentioned limitations. In addition to the technique's ability to simultaneously use multiple biocom-

¹ Inštitut za biomedicinske vede, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

² Katedra za farmakologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

³ Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Maribor, Slovenija

Korespondenca/ Correspondence:

Marko Milojević, e: marko.milojevic1@um.si

Ključne besede:

modeli *in vitro*; trebušna slinavka; bionosilci; 3D tisk; metoda tkivne rezine

Key words:

in vitro models; pancreas; bioscaffolds; 3D printing; tissue slice method

Prispelo: 18. 10. 2019

Sprejeto: 12. 5. 2020



patible materials, 3D printing enables material deposition with micrometer spatial resolution under cell-friendly conditions. The development of a functional *in vitro* pancreas model is governed by the desire to study diabetes aetiology and is one of the main goals of the *in vitro* modelling domain, which to-date remains unfulfilled. The tissue slice method, despite having some drawbacks, presents the gold standard for basic and translational studies of the pancreas, while current most advanced 3D fabricated *in vitro* pancreas models mimic only basic functions of the organ. The purpose of this review is to provide an overview of *in vitro* models with a focus on *in vitro* models of the endocrine pancreas. We will highlight different model types and fundamental elements which need to be considered when constructing a model. Emphasis will be placed on more complex 3D fabricated *in vitro* models, tissue slices, bioscaffold material properties, and use of 3D printing for the fabrication of advanced bioscaffolds. We believe that simultaneous development of advanced materials, micro-manufacturing technologies, and advanced cell culture methods presents a very promising approach towards the construction of a functional *in vitro* pancreas model.

Citirajte kot/Cite as: Milojević M, Stožer A, Maver U. Modeli *in vitro* endokrine trebušne slinavke. Zdrav Vestn. 2021;90(1-2):74-90.

DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravWestn.3001>



Avtorske pravice (c) 2021 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

1 Uvod

Poglavitni namen večine biomedicinskih raziskav je razvozlati izvor in molekularne mehanizme človekovih bolezni s ciljem razviti nove ali izboljšane preventivne, diagnostične in terapevtske pristope. Zaradi očitnih razlogov samih temeljnih raziskav ni mogoče izvajati na ljudeh, živalski modeli pa se anatomsko, fiziološko in genetsko preveč razlikujejo od človeka, tako da pogosto ne posnemajo kritičnih vidikov človeških zdravih ali patološko spremenjenih tkiv in organov, še posebej ne z želeno molekularno ločljivostjo (1). Razvoj alternativnih modelov, ki posnemajo človeško anatomijo in fiziologijo *in vitro*, je zato nujno potreben. Vzporedno je končni cilj področja tkivnega inženirstva (TI) proizvodnja funkcionalnih tkiv in organov *in vitro*, ki bi lahko služili kot nadomestki za obnovo ali zamenjavo poškodovanih in obolelih humanih delov telesa (2-4). Posamezne raziskave TI se osredinjajo predvsem na

razvoj individualnih mejnikov tega procesa za doseganje končnega cilja (npr. razvoj naprednih materialov, metod proizvodnje in celičnih virov itn.) (5,6) ter tudi na izgradnjo enostavnih modelov *in vitro*, ki posnemajo osnovne funkcije tkiv in organov *in vivo*. Da bi dosegli načela 3R – zamenjava, zmanjšanje in izboljšava (*angl.* replacement, reduction, refinement) ob etičnih omejitvah in pomanjkljivostih živalskih modelov in zastavljene cilje tkivnega inženirstva zaradi preučevanja mehanizmov bolezni v nadzorovanih pogojih, so bili povod za razvoj kompleksnih modelov *in vitro*. Področje naprednih modelov *in vitro* leži na presečišču TI, regenerativne medicine, patofiziologije, znanosti o naprednih materialih in aditivne proizvodnje ter se osredinja na posnemanje tridimenzionalne (3D) strukture in funkcionalnosti tkiv ali organov *in vitro*.

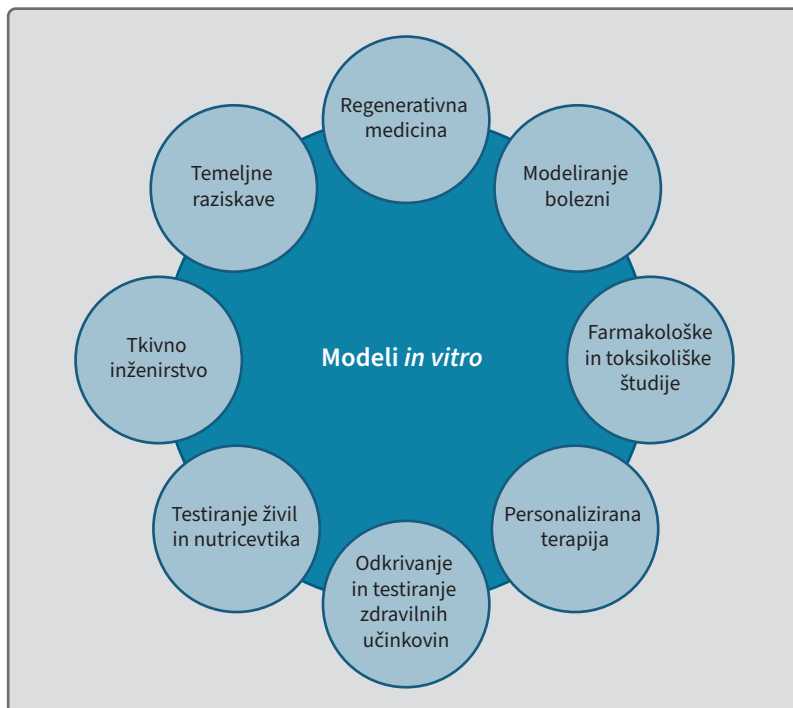
2. Modeli *in vitro*

2.1 Enostavni modeli *in vitro*

Enostavni dvodimenzionalni (2D) modeli *in vitro* se že uporabljajo za številne namene (Slika 1), kot sta razvoj in testiranje novih zdravilnih učinkovin ter za farmakološke in toksikološke študije. V ta namen se najpogosteje uporabljajo transformirane ali nesmrtno komercialno dostopne celične linije, ki pa se med dolgotrajnejšim gojenjem (večanje števila celičnih delitev) večinoma pričnejo genetsko, epigenetsko in fiziološko značilno razlikovati od izvornih celic. Za izgradnjo modelov *in vitro* so komercialne celične linije zato najslabša izbira (7,8). V nasprotju z njimi so izolirane primarne celične kulture najboljši kandidati za uporabo v modelih *in vitro*, saj najbolje predstavljajo funkcionalne enote izvornega tkiva. Izgradnja modelov *in vitro* na osnovi primarnih celičnih kultur je

predvsem omejena zaradi težavne dostopnosti in izoliranja celic, ki poleg tega v standardnih 2D celičnih kulturah težko proliferirajo in imajo kratko življenjsko dobo (t. i. Hayflickova meja) (9). Nedavno so te težave premostili z uporabo induciranih pluripotentnih matičnih celic (*angl.* induced pluripotent stem cells, iPSCs), ki jih lahko pridobimo iz somatskih celic s postopkom dediferenciacije (10). iPSCs imajo zmožnost samoobnavljanja in diferenciacije v številne zrele celične tipe, zaradi česar so izredno zanimive za uporabo v modelih *in vitro*, kjer preučujemo nastanek in potek razvoja bolezni. Razlog za redko uporabo iPSCs je dejstvo, da pa je nadzor nad diferenciacijo v zrele tipe celic izjemno kompleksen, poleg tega pa so v celični kulturi vselej prisotni tudi nezreli celični fenotipi (11,12).

Ne glede na vir in tip celic štejememo med enostavne modele *in vitro* standardne 2D enocelične kulture (sestavljene iz enega tipa celic, gojenih v celičnih posodah) in njihove nadgrajene izvedenke, kot so 2D kokulture, 2D kulture, gojene v posodah, ki so prevlečene s komponentami zunajceličnega matriksa (*angl.* extracellular matrix, ECM), in kulture, gojene na vložkih Transwell®. To pa so enostavne 2D celične kokulture, gojene na vložkih, ki posnemajo kompleksnejšo tridimenzionalno (3D) medcelično signalizacijo (13,14). Dejstvo je, da imajo takšni 2D modeli *in vitro* veliko pomanjkljivosti. Poleg tega, da se celične posode po strukturi, mehanskih lastnostih, topografiji in sestavi statistično značilno razlikujejo od izvornega tkiva, te celice ne morejo medsebojno avto- in parakrino komunicirati v vseh prostorskih razsežnostih. Prav tako so celice neenakomerno izpostavljene koncentracijskim gradientom kisika, hranilnih snovi in biološko aktivnih molekul. To vodi do



Slika 1: Področja uporabe modelov *in vitro*.

dejstva, da celice, gojene v 2D kulturah, ne izkazujejo pravilne morfologije ter pogosto ne izražajo ustreznega fenotipa dovolj dolgo. Zato ne omogočajo izvesti kompleksnejših in dolgotrajnejših eksperimentov. Posledica tega je, da enostavni modeli *in vitro* ne posnemajo ključnih značilnosti in funkcij izvornega tkiva (15,16). V nasprotju z 2D kulturami pa celice, gojene v 3D kulturah, vzpostavljajo kompleksne interakcije z ECM in sosednjimi celicami v treh prostorskih dimenzijah, zato bolje posnemajo biokemijo in mehaniko izvornega mikrookolja. Torej je za izgradnjo funkcionalno kompleksnejših modelov *in vitro* celice treba gojiti v 3D okolju oziroma na 3D celičnih nosilcih, tj. bioloških nosilcih (*angl.* bioscaffolds), ki posnemajo izvorni ECM, v katerem celice rastejo, se diferencirajo, razmnožujejo in komunicirajo v vseh prostorskih dimenzijah (17).

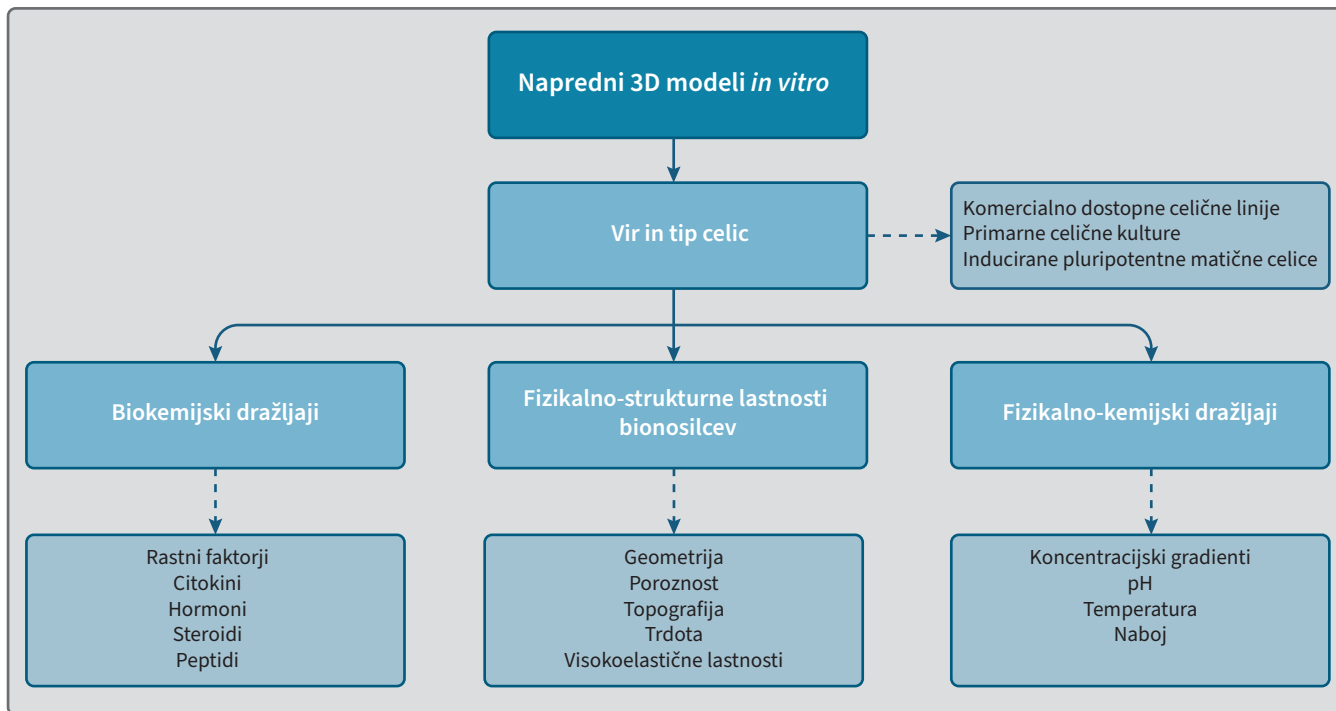
2.2 Napredni modeli *in vitro*

Napredne modele *in vitro* definiramo kot sintetične alternativne eksperimentalne sisteme, ki z uporabo modernih pristopov TI in mikroaditivne proizvodnje na osnovi živih humanih celic posnemajo fiziologijo tkiva ali organa *in vitro*. V sklopu te definicije ni mišljeno, da se kompleksna arhitektura in funkcija tkiva ali organa posnemata do popolnosti, ampak model vsaj reprezentativno posnema samo tiste ključne funkcije, ki jih želimo posnemati *in vitro*. Napredni 3D modeli *in vitro* so uporabni predvsem takrat, kadar konvencionalne 2D celične kulture ne posnemajo dovolj dobro dinamičnih odzivov izvornih tkiv (16,18). Temeljne prvine (Slika 2), ki jih moramo pri izgradnji modela *in vitro* upoštevati, so vir in tip celic (9), fizikalno-kemijski dražljaji (19) ter biološko aktivne molekule (biokemijski dražljaji) (20,21), ki

spodbujajo želeni celični fenotip.

Med najenostavnejše 3D modele *in vitro* uvrščamo sferoide in organoide, ki jih gojimo v posebnih celičnih posodah, na katere se celice ne pritrjujejo. Z ustreznimi biokemijskimi dražljaji se celice same organizirajo v enostavno kroglasto 3D obliko. Pri tem se najpogosteje uporabljajo iPSCs. Kot namiguje ime, organoidi *ex vivo* posnemajo osnovno hierarhično strukturo in fiziologijo organov, medtem ko sferoidi nimajo jasno opredeljene notranje strukture in celične organizacije (22). Organoidi se uporabljajo predvsem za temeljne raziskave *in vitro*, ki se ukvarjajo z organogenezo in s potekom nastanka bolezni (23). Poleg tega, da se organoidi med seboj bistveno razlikujejo po velikosti in obliki, je poglobljena omejitev obeh modelov velikost, saj celice v notranjosti 3D konstrukta zaradi omejene difuzije hitro nekrotizirajo (24). Za izgradnjo večjih in kompleksnejših 3D konstruktov je tako izrednega pomena izgradnja celičnih bioloških nosilcev z ustrežno poroznostjo, ki olajšajo dostop kisika in hranil do celic (17,25).

Pri izgradnji naprednih 3D modelov *in vitro* je zato treba dodatno izbrati ustrezne gradnike za proizvodnjo celičnih nosilcev z ustreznimi strukturnimi in mehanskimi lastnostmi. Nano-, mikro- in makrolastnosti modelov *in vitro* je treba prilagoditi tako, da te posnemajo značilnosti izvornega ali bolezensko spremenjenega tkiva. Poudarek mora biti tudi na posnemanju mehanskih pogojev, v katerih celice rastejo. Zato je treba izbrati primerne biološke kompatibilne materiale z ustreznimi mehanskimi lastnostmi. Pomemben del modeliranja vključuje tudi posnemanje koncentracijskih gradientov hranil, plinov, pH in presnovkov (9).



Slika 2: Ključni elementi, ki jih je treba upoštevati pri izgradnji naprednih 3D modelov *in vitro*. Po izbiri ustreznega vira in tipa celic je treba posnemati pomembne biokemijske in fizikalno-kemijske dražljaje *in vivo*, ki zagotavljajo ohranjanje zelenega celičnega fenotipa. Nujno je tudi, da 3D biološki nosilci posnemajo ključne fizikalnostrukturne lastnosti izvornega ECM.

3 Trebušna slinavka

Vse od zasnove področja modelov *in vitro* je zaradi želje po preučevanju nastanka sladkorne bolezni tipa 1 in 2 (*lat.* diabetes mellitus, DM) eden od primarnih ciljev razviti funkcionalni model trebušne slinavke *in vitro* ter zlasti Langerhansovih otočkov. Normalno delovanje človeškega telesa je odvisno od natančnega uravnavanja koncentracije glukoze v krvi. Osrednje mesto pri vzdrževanju dinamičnega ravnovesja glukoze ima trebušna slinavka, natančneje celice beta, ki se nahajajo v Langerhansovih otočkih. Te ob zvišanju koncentracije energijsko bogatih molekul v krvi (predvsem glukoze) in nekaterih hormonov (npr. inkretinov GIP in GLP-1) ter pod vplivom neurotransmitorjev (npr. CCK in acetilholina) izločajo

inzulin (26,27). Trebušna slinavka (pankreas) je približno 14–18 cm velik retroperitonealni organ, sestavljen iz treh poglavitnih anatomskih delov: glave, telesa in repa. Je žleza, ki jo tako strukturno kot funkcionalno razdelimo na večji (~95 %), eksokrini del, sestavljen predvsem iz duktalnih in acinarnih celic, in manjši (~5 %), endokrini del, sestavljen iz Langerhansovih otočkov. Acinarne celice posredno v dvanajstnik izločajo prebavne encime, ki so odgovorni za razgradnjo proteinov, lipidov in ogljikovih hidratov. Duktalne celice pa izločajo tekočino, bogato z bikarbonatnimi anioni (28). Endokrini tkiva predstavljajo pri človeku približno milijon 50–500 µm velikih endokrinih mikroorganov, imenovanih Langerhansovi otočki. Vsak otoček (tudi pri različnih vrstah) vsebuje približno 1.000 celic. Najštevilčnejše so

celice beta (50–60 %), ki izločajo inzulin, sledijo jim celice alfa (35–40 %), ki izločajo glukagon, ter celice delta (10–15 %), ki izločajo somatostatin. Manj zastopane so celice PP ali gama, ki izločajo pankreasni polipeptid, in celice epsilon, ki izločajo grelin (29). Med najpomembnejše motnje v delovanju endokrinega dela trebušne slinavke štejemo DM tipa 1 in 2. Sladkorna bolezen je presnovna bolezen, za katero je značilna nezmožnost uravnavanja homeostaze glukoze v krvi. Predvsem (avto)imunsko pogojena sladkorna bolezen tipa 1 je posledica absolutnega pomanjkanja inzulina zaradi uničenja celic beta (30). DM tipa 2 je kompleksna poligenska bolezen, na katero vplivajo tudi številni okoljski in epigenetski dejavniki. Povzroči jo zmanjšana občutljivost tarčnih tkiv za inzulin s sprva kompenzacijsko absolutno zvečanjem, a sorazmerno nezadostnim izločanjem inzulina. To končno vodi do nedelovanja sekrecije, propada celic beta in absolutnega pomanjkanja inzulina (31–33). Oba tipa bolezni lahko vodita do akutnih in kroničnih zapletov, med katerimi so srčno-žilne težave, ledvična odpoved, nevrološke poškodbe, izguba vida in splošno povečana umrljivost bolnikov (34,35). V večini temeljnih raziskav o nastanku in razvoju sladkorne bolezni se uporabljajo številni različni živalski modeli (pretežno glodavci, predvsem miši) (36). Kljub številnim podobnostim pa obstaja med ljudmi in glodavci veliko strukturnih in fizioloških razlik med Langerhansovimi otočki, kar vodi do razlik v funkcionalni sklopljenosti med celicami in končno tudi do razlik v kompleksni dinamiki izločanja inzulina (26,28). To pomeni, da rezultatov, pridobljenih na živalskih modelih, ne moremo vselej v vseh pogledih zanesljivo prenesti na človeka.

4 Modeli trebušne slinavke *in vitro*

Razvoj funkcionalnega človeškega modela trebušne slinavke *in vitro* bi pomenil preboj v temeljnih raziskavah sladkorne bolezni in vodil k razvoju novih zdravilnih učinkovin za zdravljenje sladkorne bolezni. Hkrati bi močno zmanjšal potrebo po uporabi živalskih modelov. Kljub dolgoletnemu razvijanju modelov *in vitro* pa na področju trebušne slinavke ostajajo številne težave. Prva težava pri gojenju celic trebušne slinavke *in vitro* nastane že z zahtevnim procesom osamitve in čiščenja viabilnih pankreasnih otočkov in celic znotraj otočka. Celice Langerhansovih otočkov kmalu po osamitvi, ko izgube homo- in heterotipične medcelične stike, niso več sposobne za avto- in parakrino komuniciranje. Poleg tega izgubijo kritične stike z ECM in stike z bazalno membrano, kar navsezadnje vodi do zmanjšanja viabilnosti in izgube delovanja celic. Dodatno visoke presnovne zahteve in velikost otočkov omejujejo razpolaganje in dostop kisika ter hranil do celic v notranjosti otočka. Zaradi omejene difuzije se hitro prične nekrotično propadanje celic. Vse to botruje dejstvu, da trenutni 2D celični modeli *in vitro* trebušne slinavke ob stimuliranju z glukozo ne posnemajo kritične dinamike izločanja inzulina (37). 2D substrati torej omejujejo rast pankreasnih celic, preprečujejo nastanek kompleksne 3D morfologije *in vivo* in ne posnemajo stikov tipa celice ECM, ki so kritični za normalno delovanje endokrinih celic. Še bolj v prid pomembnosti 3D okolja za diferenciacijo, rast in funkcionalnost Langerhansovih otočkov govori dejstvo, da so nedavno potrdili neposredno povezanost med morfologijo pankreasnega

otočka in endokrino diferenciacijo. Pri diferenciaciji endokrinih progenitornih celic namreč celice alfa, ki se prve razvijajo, migrirajo na zunanost otočka in tvorijo plašč, medtem ko celice beta, ki nastanejo kasneje, ostanejo v jedru otočka. Takšna časovno-prostorska sorazmernost vodi do tipične sferične 3D arhitekture človeškega pankreasnega otočka (plašč iz celic alfa in jedro iz celic beta), ki je nujno potrebna za normalno delovanje otočka (38).

4.1 3D biomimetični nosilci posnemajo ECM izvornega tkiva

V najelementarnejšem smislu je ECM naravni biološko aktivni celični nosilec, sestavljen iz strukturnih (kolageni, laminini, fibronektini) in signalnih proteinov, polisaharidov, glikoproteinov, proteoglikanov, biološko aktivnih molekul, elektrolitov in vode (39). ECM v razmerah *in vivo* ustvari kompleksno 3D ogrodje, tako da celicam zagotavlja mehansko podporo in poleg medcelične komunikacije v vseh prostorskih dimenzijah omogoča ključne celične procese, kot so adhezija, migracija, proliferacija in diferenciacija (40). ECM igra v mikrookolju pankreasnih celic ključno vlogo (41), zato je pri izgradnji naprednega modela trebušne slinavke *in vitro* izrednega pomena, da z uporabo 3D celičnih nosilcev posnemamo osnovne lastnosti izvornega ECM (42,43).

Splošno morajo celični nosilci posnemati kompleksno 3D mikroarhitekturo, hierarhično strukturo in sestavo ECM izvornega tkiva, ki ga želimo posnemati *in vitro*. Osnovne gradnike, 3D strukturo in sestavo pankreasnega ECM najbolje posnemajo nosilci, zgrajeni iz naravnih polimerov (predvsem polisaharidov). Ti tvorijo hidrogelne ter pozitivno vplivajo

na rast in viabilnost celic trebušne slinavke (44). Zato se za izgradnjo naprednih modelov trebušne slinavke *in vitro* (Langerhansovih otočkov) vlaga velik trud v razvoj 3D biomimetičnih celičnih nosilcev, ki posnemajo osnovne gradnike izvornega mikrookolja (ECM), s katerim so pankreasne celice obdane. Ključno merilo pri izgradnji nosilca je izbira ustreznega materiala. Temeljiti mora na mehanskih lastnostih tkiva, saj igra predvsem površina materiala pomembno vlogo pri usmerjanju rasti in razvoja celic, poleg tega pa je osrednji vmesnik za medcelične interakcije (45). Trebušna slinavka je nelinearno viskozno-elastično mehko tkivo z nizko strižno togostjo (46). Zato so naravni polimerni hidrogeli, ki imajo visok delež vode in izkazujejo podobne strukturne ter mehanske lastnosti kot pankreasni ECM, najboljši materiali za izgradnjo celičnih nosilcev (47). Poleg biološke kompatibilnosti sta osnovne lastnosti, ki ju moramo še upoštevati pri izgradnji bionosilca, struktura in elementarni gradniki nosilca. Topografske, materialne in fizikalne značilnosti vseh velikostnih razredov (npr. makro-, nano- in mikropopografija, makro- in mikroporoznost) so strukturni dražljaji, ki usmerjajo obnašanje celic. Izbira biološko kompatibilnih materialov mora temeljiti na dejstvu, da tako mikro- kot makrolastnosti nosilcev posnemajo značilnosti izvornega ali patološko spremenjenega tkiva trebušne slinavke. Površinske lastnosti nosilcev (npr. hrapavost), njihove mehanske lastnosti, mikrostrukutra (npr. velikost in oblika por) in druge značilnosti (npr. nabrekanje in biološka razgradljivost nosilca) značilno vplivajo na rast in fenotip celic (48). Celice trebušne slinavke, ki so jih gojili *in vitro* na 3D celičnih nosilcih, so se lahko diferencirale v fiziološko primerno tkivo, hkrati pa

se je njihova morfologija značilno razlikovala od celic, gojenih v 2D celičnih kulturah. V primerjavi z 2D substrati so s 3D nosilci, zgrajeni iz polisaharidov, spodbujali tudi boljšo adhezijo, proliferacijo in preživetje celic (49-51).

Čeprav materiali naravnega izvora predstavljajo dobro izbiro za izgradnjo 3D biološko mimetičnih nosilcev, pa ne morejo posnemati kompleksnosti ECM izvornega tkiva povsem do potankosti. Nedavno razvite tehnike tkivne decelularizacije (*angl.* decellularised extracellular matrices, dECM) obljublajo možnost izgradnje celičnih nosilcev dECM, ki skoraj popolnoma posnemajo kompleksnost izvornega tkiva. Celične nosilce dECM lahko pridobimo iz različnih tkiv z metodo decelularizacije, ki ponavadi zajema lizo in odstranitev celic iz tkiva s perfuzijo z deionizirano vodo ali z detergenti (52,53). Tako po procesu ostane samo tkivnospecifični ECM, ki ponavadi zajema makromolekule, kot so kolageni, laminini, fibronektin, elastin in druge tkivnospecifične glikozaminoglikane, citokine in rastne dejavnike. Nedavno je skupina znanstvenikov dokazala, da takšni specifični nosilci dECM značilno vplivajo tudi na delovanje celic trebušne slinavke. Z metodo decelularizacije so iz trebušne slinavke uspešno pripravili celične nosilce z unikatno sestavo, fizikalno strukturo in biološko aktivnostjo. Celice iPSCs, gojene na specifičnih nosilcih za trebušno slinavko, so se spontano diferencirale v celice, podobne celicam trebušne slinavke, ki so pri tem tudi začele izražati ustrezne gene (54). Iz tkiva trebušne slinavke pripravljen dECM so uspešno uporabili tudi že za 3D tisk biološko mimetičnih celičnih nosilcev. Takšni 3D tiskani nosilci dECM so spodbujali diferenciranje iPSCs proti pankreasnemu fenotipu, hkrati pa so

ohranjali dolgoročno viabilnost in funkcijo izoliranih Langerhansovih otočkov (55). Največja težava pri uporabi dECM ostaja dejstvo, da se med procesom decelulariziranja poruši visoko specifična prostorska razporeditev proteinov in drugih molekul. Zato trenutni cilj pri razvoju ostaja iskanje ravnotežja med popolno odstranitvijo celičnih komponent in ohranitvijo malih žil (kapilar) in drugih tkivnih struktur. Prav tako so na celicah, gojenih na nosilcih dECM, opazili toksične učinke, ki so najverjetneje posledica preostanka detergentov, uporabljenih med procesom (56).

Trenutno največjo omejitev na področju izgradnje 3D nosilcev, ki dolgoročno podpirajo rast celic trebušne slinavke, predstavljajo neustrezne mehanske lastnosti materialov, še posebej hidrogelov. Za izboljšanje mehanske stabilnosti hidrogelov se uporabljajo različne tehnike zamreženja (npr. ionsko zamreženje), anorganski/organski dodatki (celulozna vlakna, različni nanodelci) (57,58) ali drugi sintetični materiali (polikaprolakton). Ti nosilcu izboljšajo mehanske lastnosti oziroma nudijo primerno osnovno ogrodje (57,59). Dodatna težava pa je dejstvo, da je izjemno težko tako prilagajati prej omenjene ključne značilnosti nosilcev (poroznost, topografija, mehanske lastnosti, hitrost razpada in privzema vode, reološke lastnosti materialov), da bi ti popolnoma posnemali lastnosti izvornega tkiva. Razvoj hidrogelnih formulacij, na podlagi katerih bi bilo možno izdelati dolgoročno stabilne celične nosilce in katerim bi lahko dodatno priljubno prilagajali želene lastnosti (npr. viskozno-elastične, mehanske, površinske), bi pomenil izjemen napredek na področju izgradnje naprednih modelov *in vitro* (60).

5 3D tisk za izgradnjo *in vitro* modelov

Kljub vsem tehnološkim napredkom na področju TI pa ostaja razvoj fiziološko relevantnih tkiv, posebej trebušne slinavke, še naprej težaven. Zaradi omejitve v difuziji kisika in hranil je izgradnja konstruktov, večjih od 200 μm , izredno problematična (25). Napredovanje k izgradnji večjih tkivnih konstruktov zavira dejstvo, da je treba v nosilec vključiti funkcionalnost žilja za zagotavljanje in izboljšanje prenosa kisika in hranil do celic, hkrati pa spodbujati odstranjevanje njihovih odpadnih snovi. Izgradnja 3D mrež žilja znotraj tkivnih konstruktov igra ključno vlogo pri dolgoročnem preživetju in ohranjanju viabilnosti celic v modelih *in vitro* (61,62). Do danes raziskovalcem še ni uspelo razviti celičnih nosilcev za izgradnjo modelov mehkih tkiv *in vitro*, ki bi izkazovali hkrati ustrezno ločljivost, strukturno integriteto in zahtevano biološko kompatibilnost (63). Več TI pristopov (64-67) so razvili zato, da bi te težave odpravili, vendar se jih večina omejuje na indiciranje angiogeneze *in vitro*. Poleg tega, da takšni pristopi zahtevajo dolgotrajno inkubacijo za formiranje žilja in tudi uporabo dragih rastnih dejavnikov (npr. *angl.* vascular endothelial growth factor, VEGF), je njihova osrednja pomanjkljivost omejena ponovljivost ter nezmožnost prostorskega nadziranja razporeditve žilja znotraj konstrukta, ki pogosto sploh ne omogoči perfuzije. Zadnja leta se pogosteje za proizvodnjo celičnih nosilcev na osnovi biološko kompatibilnih materialov, naprednih modelov *in vitro* in tkivnih konstruktov z vključenim žiljem uporabljajo aditivni pristopi, kot je 3D tisk (68). Pri tem se različne tehnike aditivne proizvodnje razvijajo in uporabljajo hkrati (npr. litografske tehnike, t.i. tisk ink-jet,

mikroekstruzijske metode) za izgradnjo 3D celičnih nosilcev, ki bolje posnemajo arhitekturo, biokemijo in funkcionalnost izvornih tkiv. Posamezne tehnike izkazujejo določene prednosti in slabosti (52). Med njimi 3D biotisk predstavlja novo in najobetavnejšo uporabljeno metodo, za katero se pričakuje, da bo naravnost revolucionarizirala področje izgradnje naprednih modelov *in vitro*. Poleg zmožnosti hkratne uporabe velikega nabora biološko kompatibilnih materialov in izjemne vsestranskosti apliciranja (69,70) 3D biološki tiskalnik omogoča nalaganje materiala z mikrometrsko prostorsko ločljivostjo (71) pri pogojih, ki so celicam prijazni, kot so npr. nizke strižne sile (72,73). To daje 3D tiskalniku veliko prednost pred ostalimi konvencionalnimi tehnikami za pripravo celičnih nosilcev, ki jih pogosto omejuje prav nadziranje 3D oblike, prostorska postavitev posameznih komponent materiala in s tem lokalna porazdelitev gostote nanaša materiala in celic (74).

5.1 Tehnika 3D tiska *core/shell* za izgradnjo naprednih modelov *in vitro*

Kot smo že omenili, je za razvoj večjih in fiziološko kompleksnejših modelov *in vitro* izrednega pomena izgradnja celičnih nosilcev, ki omogočajo nemoten pretok celičnega medija ali celo posnemajo osnovno funkcionalnost svetline žile. Verjetno najboljši in najenostavnejši pristop k izgradnji 3D tiskanega pretočnega modela *in vitro* je vključitev povezane mreže votlih kanalov v notranjosti tkivnega nosilca. Izgradnja takšnega biološkega nosilca bi zmanjšala verjetnost za nastajanje nekrotičnih območij v konstruktu in rešila tudi številne druge že omenjene pomanjkljivosti dosedanjih modelov (73). V votle kanale nosilcev

lahko dodatno naselimo endotelne celice, s čimer dobe zmožnost posnemati sintetične žile v 3D tkivnih modelih (75). Poleg že omenjene olajšane difuzije kisika, dotoka hranil, nemotenega odstranjevanja CO₂ in presnovkov lahko takšne svetline kanalov glede na specifično *in vitro* gojenega tkiva izpolnjujejo tudi druge pomembne fiziološke naloge. Pri modelih endokrinih tkiv *in vitro* omogočajo zbiranje sekreta in ocenijo sekrecijske funkcije konstrukta, pri eksokrinih tkivih pa odvajanje sekreta in njegovo zbiranje za kvantificiranje. Za izgradnjo naprednega 3D modela *in vitro* celotne trebušne slinavke, ki bi vključeval tako endokrini kot eksokrini del, je treba v biološki nosilec poleg svetlin, kamor endokrine celice izločajo svoj sekret, dodatno vključiti tudi duktuse za odvajanje encimov, ker bi aktiviranje le-teh lahko vodilo v avtodigestijo oziroma sprožilo celo pankreatitis *in vitro* gojenega tkiva.

Nedavno je veliko pozornosti pritegnila nova različica metode 3D tiska votlih kanalov (t. i. tisk core/shell) (76-79), saj obljublja hitro, enostavno in ponovljivo izgradnjo stabilnih celičnih nosilcev z vgrajenimi pretočnimi kanali. Z uporabo koaksialne šobe omogoča t.i. tisk core/shell sočasno 3D tiskanje dveh materialov, pri čemer se eden iztisne kot jedrni filament (*angl.* core), drugi pa kot ovoj okoli prvega (*angl.* shell). Tehnika odpira možnost, da z izbiro bioloških materialov z različnimi mehanskimi lastnostmi trši material med tiskom in ponjem strukturno podpira mehkejšega. Če za izgradnjo nosilca uporabimo material, ki ga je možno kemijsko zamrežiti (npr. alginat) ter ga iztисnemo kot ovoj, v jedro pa hkrati iztисnemo zamreževalec (npr. CaCl₂), se potem v enem samem procesnem koraku lahko izgradi celo stabilen biološki nosilec z votlimi filamenti

(80). Koaksialni tisk so že uporabili za izgradnjo nosilcev s čvrstimi (81), t.i. core/shell (82) in votlimi filamenti (83). Toda uporabljenih materialov še niso optimizirali za sočasno celično viabilnost in celo mehansko robustnost konstrukta. Ne glede na vse prednosti tako navadnega 3D tiska kot t.i. core/shell še vedno predstavlja velik izziv, kako razviti ustrezne materialne formulacije (*angl.* ink), ki izkazujejo hkrati vse potrebne lastnosti, primerne za 3D tiskanje, in izpolnjujejo vse biološke zahteve (84).

6 Tkivna rezina kot model trebušne slinavke *in vitro*

Zaradi doslej prikazanih številnih omejitev in zahtevnosti izgradnje dobrih 3D modelov trebušne slinavke, ker ima ta organ kompleksno zgradbo in delovanja (28,85), se za bazične in translacijske študije trebušne slinavke še vedno večinoma uporabljajo izolirane endokrine celice, predvsem celice beta, izolirane acinarne celice, izolirani Langerhansovi otočki in izolirani duktusi in acinusi (86,87). Rezultati teh raziskav se pogosto dopolnjujejo z različnimi meritvami *in vivo* na ravni celotnega organizma (88). Pomemben korak k čim boljšemu 3D modelu za tkivo trebušne slinavke, ki je alternativen v številnih pogledih, deloma pa tudi dopolnjuje razvoj 3D modelov s pomočjo različnih nosilcev in 3D tiska, so pred kratkim razvili in vedno pogosteje uporabljajo metodo tkivne rezine trebušne slinavke (86,89).

Pri tej metodi se z mikrotomom nareže tkivo trebušne slinavke različnih vrst modelnih organizmov (najpogosteje miši, lahko tudi podgane ali prašiča) ali človeka na tkivne rezine, debeline približno 100 mikrometrov. Ob tem se za razliko od izoliranja celic in otočkov ne uporabljajo encimi, ampak le minimalni mehanski

stres zaradi rezanja. Tkivne rezine vsebujejo brezhibne Langerhansove otočke, prerezane Langerhansove otočke, velika področja brezhibnih acinusov in dolge odseke duktusov različnih velikostnih redov. Ena najpomembnejših lastnosti tako pridobljenih tkivnih rezin je, da so celice znotraj Langerhansovih otočkov in znotraj acinusov med seboj povezane z različnimi medceličnimi stiki, hkrati pa je ohranjeno parakrino medsebojno delovanje znotraj endokrinega dela, znotraj eksokrinega dela in med obema deloma. V večji meri kot pri izoliranju otočkov in acinusov so tudi ohranjene žile, bazalna membrana, vezivne ovojnice, imunske celice in drugi elementi mezenhima, s tem pa 3D zgradba tkiva (86,87,90,91). Akutna rezina trebušne slinavke je tako posebna oblika primarne celične kulture, ki se lahko brez posebnih dodatnih nosilcev uporablja vsaj 24–48 ur (87,92).

V kombinaciji z elektrofiziološkimi meritvami, meritvami koncentracije znotrajceličnih kalcijevih ionov, meritvami sekrecije in različnimi morfološki meritvami se je pokazalo, da je metoda tkivne rezine po rezultatih in ponovljivosti vsaj enakovredna metodam izoliranja celic in otočkov oziroma acinusov (93-99). V številnih pogledih pa tkivna rezina omogoča bolj fiziološke podatke, predvsem ko gre za oceno komunikacije med različnimi celicami (37,100-102). Dodatna pomembna prednost metode tkivne rezine je, da je dobro združljiva s številnimi različnimi modelnimi organizmi s fluorescenčno označenimi celicami, ki nas zanimajo, hkrati pa tudi z modeli za sladkorno bolezen, ki vodijo v propadanje večine celic beta (npr. streptozotocinski model) in tako niso združljivi z izoliranjem celic ali otočkov, saj v teh primerih dobimo premalo izolata (103,104). Rezultati morfoloških in

funkcionalnih meritev v rezini postajajo zlati standard na tem področju, hkrati pa tudi pomembna referenca za meritve v drugih 3D modelih.

Končno naj poudarimo, da se v zadnjem času tkivne rezine uporabljajo tudi v kombinaciji s posebnimi nosilci, ki podaljšajo življenjsko dobo rezine *ex vivo* in njeno uporabnost za študije vsaj do enega tedna (87). Pri uporabi človeškega tkiva se predvideva, da bodo nosilci morali omogočiti prenos tkiva v trajanju več dni, da se le-to lahko uporabi v študijah v tistih delih sveta, kjer ni lokalnega vira človeškega tkiva oziroma za meritve v specializiranih laboratorijih z metodami, ki niso na voljo na mestu vira človeškega tkiva. Predvidevamo, da se bo večji ali manjši del tkiva iz rezine lahko v prihodnje uporabil tudi za izgradnjo 3D modelov s pomočjo že omenjenih naprednih materialov in tehnik kombiniranja celic s temi materiali (60).

7 Pogled v prihodnost

Kljub izjemnim napredkom tako v širši interdisciplinarni domeni tkivnega inženirstva kot na ožjem področju modelov *in vitro* trebušne slinavke čakajo obe področji še vedno številni problemi, ki jih je potrebno premostiti. Trenutni najnaprednejši modeli 3D *in vitro* posnemajo le osnovne funkcije posameznih tkiv in organov, zato se kljub pomanjkljivostim kot zlati standard za izvajanje bazičnih študij (še posebej pri trebušni slinavki) uporabljajo tkivne rezine. Korak v pravo smer pomeni razvoj dveh na videz nepovezanih področij mikrofluidike in proizvodnje računalniških mikročipov. T. i. organi-na-čipu so celične kulture, gojene na naprednih mikrofluidnih napravah (105). S tehnikami proizvodnje mikročipov (npr. mehke litografije) (106) je mogoče z visoko natančnostjo

izdelati pretočne nosilce, ki bolje posnemajo fizikalno-kemijske (koncentracijski gradienti plinov in hranilnih snovi), strukturne (nano-topologija) in biokemijske dražljaje (koncentracijski gradienti biološko aktivnih molekul) tkiv, ki jih posnemajo. Poleg tega se celice v takšnih napravah ne gojijo v statičnem okolju celičnih posod ali 3D bionosilcev, ampak so neprekinjeno izpostavljene pretoku celičnega medija. Perfuzija medija posnema ključne fizikalno-kemijske dražljaje (nastanek strižnih sil in koncentracijskih gradientov), ki so jim celice izpostavljene v izvornem okolju. Hkrati pa olajša difuzijo kisika in hranil ter omogoča odstranjevanje odpadnih produktov (107). Celice Langerhansovega otočka, gojene v takšnem mikrofluidnem okolju, so npr. pokazale pravilnejšo morfologijo in izboljšano viabilnost v primerjavi s statičnimi kulturami. Dodatno pa so celice beta ob stimuliranju z glukozo dlje časa ohranile ustrezno dinamiko izločanja inzulina (108,109). Prihodnje raziskave na področju organov-na-čipu se bodo osredinjale na funkcionalno povezavo posameznih organov in na razvoj t. i. telesa-na-čipu ter dodatno sklopitev sistema z mikrosenzorji. To ne bo omogočalo zgolj vpogleda v delovanje in odzive posameznih

celic, ampak tudi v kompleksno signaliziranje in komuniciranje med različnimi tkivi in organi v stvarnem času. S tem se bodo med drugim odprle številne nove možnosti v farmakoloških in toksikoloških študijah, omogočal naprednejši in ciljni razvoj zdravilnih učinkovin, pa tudi razvoj modelov bolezni z vplivom na več organov hkrati (110). Trenuten razvoj nakazuje, da bodo sočasni razvoj (1) naprednih materialov z dinamično prilagodljivimi mehanskimi, fizikalno-kemijskimi in strukturnimi lastnostmi, (2) natančnejših metod mikroaditivne proizvodnje za izgradnjo kompleksnejših bionosilcev (3) ter uporaba novih celičnih virov in (4) optimiziranje pogojev gojenja celičnih kultur, vodili do izgradnje naprednih modelov *in vitro*, ki bodo popolnoma in reprezentativno posnemali hierarhično strukturo in funkcionalnost tkiv ali organov *in vivo*.

8 Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za finančno pomoč v okviru programa Mladih raziskovalcev in v okviru pogodb P-0036, P3-0396, I0-0029, N3-0048, N3-0133, J3-9289 ter J3-1762.

Literatura

1. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al.; Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(9):3507-12. DOI: [10.1073/pnas.1222878110](https://doi.org/10.1073/pnas.1222878110) PMID: 23401516
2. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg*. 2016;51(1):8-12. DOI: [10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022](https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022) PMID: 26711689
3. Atala A, Kasper FK, Mikos AG. Engineering complex tissues. *Sci Transl Med*. 2012;4(160):160rv12. DOI: [10.1126/scitranslmed.3004890](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004890) PMID: 23152327
4. Khademhosseini A, Vacanti JP, Langer R. Progress in tissue engineering. *Sci Am*. 2009;300(5):64-71. DOI: [10.1038/scientificamerican0509-64](https://doi.org/10.1038/scientificamerican0509-64) PMID: 19438051
5. Wobma H, Vunjak-Novakovic G. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2016;22(2):101-13. DOI: [10.1089/ten.teb.2015.0535](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0535) PMID: 26714410

6. Park KM, Shin YM, Kim K, Shin H. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2017: A Year in Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018;24(5):327-44. DOI: [10.1089/ten.teb.2018.0027](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0027) PMID: [29652594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29652594/)
7. Skelin M, Rupnik M, Cencic A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX.* 2010;27(2):105-13. DOI: [10.14573/altex.2010.2.105](https://doi.org/10.14573/altex.2010.2.105) PMID: [20686743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20686743/)
8. Nestor CE, Ottaviano R, Reinhardt D, Cruickshanks HA, Mjoseng HK, McPherson RC, et al. Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems. *Genome Biol.* 2015;16(1):11. DOI: [10.1186/s13059-014-0576-y](https://doi.org/10.1186/s13059-014-0576-y) PMID: [25648825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25648825/)
9. Horvath P, Aulner N, Bickle M, Davies AM, Nery ED, Ebner D, et al. Screening out irrelevant cell-based models of disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(11):751-69. DOI: [10.1038/nrd.2016.175](https://doi.org/10.1038/nrd.2016.175) PMID: [27616293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27616293/)
10. Singh VK, Kumar N, Kalsan M, Saini A, Chandra R. Mechanism of induction: induced pluripotent stem cells (iPSCs). *J Stem Cells.* 2015;10(1):43-62. PMID: [26665937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26665937/)
11. Wills QF, Boothe T, Asadi A, Ao Z, Warnock GL, Kieffer TJ, et al. Statistical approaches and software for clustering islet cell functional heterogeneity. *Islets.* 2016;8(2):48-56. DOI: [10.1080/19382014.2016.1150664](https://doi.org/10.1080/19382014.2016.1150664) PMID: [26909740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26909740/)
12. de Lázaro I, Yilmazer A, Kostarelos K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? *J Control Release.* 2014;185:37-44. DOI: [10.1016/j.jconrel.2014.04.011](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.011) PMID: [24746625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24746625/)
13. Elliott NT, Yuan F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci.* 2011;100(1):59-74. DOI: [10.1002/jps.22257](https://doi.org/10.1002/jps.22257) PMID: [20533556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20533556/)
14. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2013;18(5-6):240-9. DOI: [10.1016/j.drudis.2012.10.003](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003) PMID: [23073387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23073387/)
15. 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. DOI: [10.1111/joa.12257](https://doi.org/10.1111/joa.12257) PMID: [25411113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25411113/)
16. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207-18. DOI: [10.1089/adt.2014.573](https://doi.org/10.1089/adt.2014.573) PMID: [24831787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24831787/)
17. Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;5:40. DOI: [10.3389/fbioe.2017.00040](https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00040) PMID: [28798911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28798911/)
18. Mattei G, Giusti S, Ahluwalia A. Design criteria for generating physiologically relevant in vitro models in bioreactors. *Processes (Basel).* 2014;2(3):548-69. DOI: [10.3390/pr2030548](https://doi.org/10.3390/pr2030548)
19. Di Nardo P, Minieri M, Ahluwalia A. Engineering the Stem Cell Niche and the Differentiative Micro- and Macromicroenvironment: Technologies and Tools for Applying Biochemical, Physical and Structural Stimuli and Their Effects on Stem Cells. In: Artmann GM, Minter S, Hescheler J, eds. *Stem Cell Engineering.* Berlin: Heidelberg: Springer; 2011. pp. 41-59.
20. Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface.* 2011;8(55):153-70. DOI: [10.1098/rsif.2010.0223](https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0223) PMID: [20719768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20719768/)
21. Tayalia P, Mooney DJ. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Adv Mater.* 2009;21(32-33):3269-85. DOI: [10.1002/adma.200900241](https://doi.org/10.1002/adma.200900241) PMID: [20882497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20882497/)
22. Huch M, Koo BK. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development.* 2015;142(18):3113-25. DOI: [10.1242/dev.118570](https://doi.org/10.1242/dev.118570) PMID: [26395140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26395140/)
23. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell.* 2016;165(7):1586-97. DOI: [10.1016/j.cell.2016.05.082](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082) PMID: [27315476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27315476/)
24. Dutta D, Heo I, Clevers H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol Med.* 2017;23(5):393-410. DOI: [10.1016/j.molmed.2017.02.007](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.007) PMID: [28341301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28341301/)
25. Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15(3):353-70. DOI: [10.1089/ten.teb.2009.0085](https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0085) PMID: [19496677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19496677/)
26. Skelin Klemen M, Dolenšek J, Slak Rupnik M, Stožer A. The triggering pathway to insulin secretion: functional similarities and differences between the human and the mouse β cells and their translational relevance. *Islets.* 2017;9(6):109-39. DOI: [10.1080/19382014.2017.1342022](https://doi.org/10.1080/19382014.2017.1342022) PMID: [28662366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28662366/)
27. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med.* 2016;48(3):e219. DOI: [10.1038/emmm.2016.6](https://doi.org/10.1038/emmm.2016.6) PMID: [26964835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26964835/)
28. Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets.* 2015;7(1):e1024405. DOI: [10.1080/19382014.2015.1024405](https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405) PMID: [26030186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26030186/)
29. Stožer A. Pancreas Physiology and Pathophysiology in Tissue Slices. *Gastroenterolog.* 2017;21(Suppl 3):68-73.
30. Tuomi T, Santoro N, Caprio S, Cai M, Weng J, Groop L. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet.* 2014;383(9922):1084-94. DOI: [10.1016/S0140-6736\(13\)62219-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62219-9) PMID: [24315621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24315621/)
31. Stožer A, Hojs R, Dolenšek J. Beta Cell Functional Adaptation and Dysfunction in Insulin Resistance and the Role of Chronic Kidney Disease. *Nephron.* 2019;143(1):33-7. DOI: [10.1159/000495665](https://doi.org/10.1159/000495665) PMID: [30650405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30650405/)

32. Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(6):707-15. DOI: [10.1038/clpt.2012.149](https://doi.org/10.1038/clpt.2012.149) PMID: [23047653](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23047653/)
33. Gupta D, Krueger CB, Lastra G. Over-nutrition, obesity and insulin resistance in the development of β -cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev.* 2012;8(2):76-83. DOI: [10.2174/157339912799424564](https://doi.org/10.2174/157339912799424564) PMID: [22229253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22229253/)
34. King A, Bowe J. Animal models for diabetes: understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol.* 2016;99:1-10. DOI: [10.1016/j.bcp.2015.08.108](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.108) PMID: [26432954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26432954/)
35. Harcourt BE, Penfold SA, Forbes JM. Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(2):113-23. DOI: [10.1038/nrendo.2012.236](https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.236) PMID: [23296171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23296171/)
36. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2005;22(4):359-70. DOI: [10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x) PMID: [15787657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15787657/)
37. Gosak M, Markovič R, Dolenšek J, Rupnik MS, Marhl M, Stožer A, et al. Network science of biological systems at different scales: a review. *Phys Life Rev.* 2018;24:118-35. DOI: [10.1016/j.plrev.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.plrev.2017.11.003) PMID: [29150402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29150402/)
38. Sharon N, Chawla R, Mueller J, Vanderhooft J, Whitehorn LJ, Rosenthal B, et al. A Peninsular Structure Coordinates Asynchronous Differentiation with Morphogenesis to Generate Pancreatic Islets. *Cell.* 2019;176(4):790-804.e13. DOI: [10.1016/j.cell.2018.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.003) PMID: [30661759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30661759/)
39. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):786-801. DOI: [10.1038/nrm3904](https://doi.org/10.1038/nrm3904) PMID: [25415508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25415508/)
40. Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(19):9064-8. DOI: [10.1073/pnas.89.19.9064](https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9064) PMID: [1384042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1384042/)
41. Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol.* 1999;161(3):357-64. DOI: [10.1677/joe.0.1610357](https://doi.org/10.1677/joe.0.1610357) PMID: [10333538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10333538/)
42. Li W, Lee S, Ma M, Kim SM, Guye P, Pancoast JR, et al. Microbead-based biomimetic synthetic neighbors enhance survival and function of rat pancreatic β -cells. *Sci Rep.* 2013;3(1):2863. DOI: [10.1038/srep02863](https://doi.org/10.1038/srep02863) PMID: [24091640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24091640/)
43. Mao GH, Chen GA, Bai HY, Song TR, Wang YX. The reversal of hyperglycaemia in diabetic mice using PLGA scaffolds seeded with islet-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biomaterials.* 2009;30(9):1706-14. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2008.12.030](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.030) PMID: [19135250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19135250/)
44. Nagata N, Gu Y, Hori H, Balamurugan AN, Touma M, Kawakami Y, et al. Evaluation of insulin secretion of isolated rat islets cultured in extracellular matrix. *Cell Transplant.* 2001;10(4-5):447-51. DOI: [10.3727/000000001783986549](https://doi.org/10.3727/000000001783986549) PMID: [11549070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11549070/)
45. Maver T, Gradišnik L, Kurečič M, Hribernik S, Smrke DM, Maver U, et al. Layering of different materials to achieve optimal conditions for treatment of painful wounds. *Int J Pharm.* 2017;529(1-2):576-88. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2017.07.043](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.043) PMID: [28723409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28723409/)
46. Wex C, Fröhlich M, Brandstädter K, Bruns C, Stoll A. Experimental analysis of the mechanical behavior of the viscoelastic porcine pancreas and preliminary case study on the human pancreas. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;41:199-207. DOI: [10.1016/j.jmbbm.2014.10.013](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.10.013) PMID: [25460416](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25460416/)
47. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2009;103(4):655-63. DOI: [10.1002/bit.22361](https://doi.org/10.1002/bit.22361) PMID: [19472329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19472329/)
48. Chang H-I, Wang Y. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. London: IntechOpen Limited; 2011. DOI: [10.5772/21983](https://doi.org/10.5772/21983)
49. Tuch BE, Gao SY, Lees JG. Scaffolds for islets and stem cells differentiated into insulin-secreting cells. *Front Biosci.* 2014;19(1):126-38. DOI: [10.2741/4199](https://doi.org/10.2741/4199) PMID: [24389176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24389176/)
50. Khorsandi L, Khodadadi A, Nejad-Dehbashi F, Saremy S. Three-dimensional differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Cell Tissue Res.* 2015;361(3):745-53. DOI: [10.1007/s00441-015-2140-9](https://doi.org/10.1007/s00441-015-2140-9) PMID: [25795142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25795142/)
51. Aloysious N, Nair PD. Enhanced survival and function of islet-like clusters differentiated from adipose stem cells on a three-dimensional natural polymeric scaffold: an in vitro study. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(9-10):1508-22. DOI: [10.1089/ten.tea.2012.0615](https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0615) PMID: [24359126](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24359126/)
52. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773-85. DOI: [10.1038/nbt.2958](https://doi.org/10.1038/nbt.2958) PMID: [25093879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25093879/)
53. Baptista PM, Orlando G, Mirmalek-Sani SH, Siddiqui M, Atala A, Soker S. Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009;2009:6526-9. DOI: [10.1109/IEMBS.2009.5333145](https://doi.org/10.1109/IEMBS.2009.5333145) PMID: [19964173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19964173/)
54. Berger C, Bjørlykke Y, Hahn L, Mühlemann M, Kress S, Walles H, et al. Matrix decoded - A pancreatic extracellular matrix with organ specific cues guiding human iPSC differentiation. *Biomaterials.* 2020;244:119766. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2020.119766](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119766) PMID: [32199284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32199284/)

55. Kim J, Shim IK, Hwang DG, Lee YN, Kim M, Kim H, et al. 3D cell printing of islet-laden pancreatic tissue-derived extracellular matrix bioink constructs for enhancing pancreatic functions. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2019;7(10):1773-81. DOI: [10.1039/C8TB02787K](https://doi.org/10.1039/C8TB02787K) PMID: [32254919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32254919/)
56. Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB, Baptista PM, Aboushwareb T, Atala A, et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials*. 2012;33(31):7756-64. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2012.07.023](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.023) PMID: [22841923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22841923/)
57. Lee VK, Dai G. Printing of Three-Dimensional Tissue Analogs for Regenerative Medicine. *Ann Biomed Eng*. 2017;45(1):115-31. DOI: [10.1007/s10439-016-1613-7](https://doi.org/10.1007/s10439-016-1613-7) PMID: [27066784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27066784/)
58. Utech S, Boccaccini AR. A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers. *J Mater Sci*. 2016;51(1):271-310. DOI: [10.1007/s10853-015-9382-5](https://doi.org/10.1007/s10853-015-9382-5)
59. Do AV, Khorsand B, Geary SM, Salem AK. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(12):1742-62. DOI: [10.1002/adhm.201500168](https://doi.org/10.1002/adhm.201500168) PMID: [26097108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26097108/)
60. Milojević M, Gradišnik L, Stergar J, Skelin Klemen M, Stožer A, Vesenjaj M, et al. Development of multifunctional 3D printed bioscaffolds from polysaccharides and NiCu nanoparticles and their application. *Appl Surf Sci*. 2019;488:836-52. DOI: [10.1016/j.apsusc.2019.05.283](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.05.283)
61. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2008;26(8):434-41. DOI: [10.1016/j.tibtech.2008.04.009](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.009) PMID: [18585808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18585808/)
62. Bae H, Puranik AS, Gauvin R, Edalat F, Carrillo-Conde B, Peppas NA, et al. Building vascular networks. *Sci Transl Med*. 2012;4(160). DOI: [10.1126/scitransmed.3003688](https://doi.org/10.1126/scitransmed.3003688) PMID: [23152325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23152325/)
63. Štumberger G, Vihar B. Freeform Perfusible Microfluidics Embedded in Hydrogel Matrices. *Materials (Basel)*. 2018;11(12):2529. DOI: [10.3390/ma11122529](https://doi.org/10.3390/ma11122529) PMID: [30545119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30545119/)
64. Ibrahim M, Richardson MK. Beyond organoids: in vitro vasculogenesis and angiogenesis using cells from mammals and zebrafish. *Reprod Toxicol*. 2017;73:292-311. DOI: [10.1016/j.reprotox.2017.07.002](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.002) PMID: [28697965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28697965/)
65. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1751-61. DOI: [10.1089/ten.tea.2008.0254](https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0254) PMID: [19196139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19196139/)
66. Davies NH, Schmidt C, Bezuidenhout D, Zilla P. Sustaining neovascularization of a scaffold through staged release of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-BB. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(1-2):26-34. DOI: [10.1089/ten.tea.2011.0192](https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0192) PMID: [21895488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21895488/)
67. Li X, He J, Zhang W, Jiang N, Li D. Additive manufacturing of biomedical constructs with biomimetic structural organizations. *Materials (Basel)*. 2016;9(11):909. DOI: [10.3390/ma9110909](https://doi.org/10.3390/ma9110909) PMID: [28774030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28774030/)
68. Maver T, Smrke D, Kurečič M, Gradišnik L, Maver U, Kleinschek KS. Combining 3D printing and electrospinning for preparation of pain-relieving wound-dressing materials. *J Sol-Gel Sci Technol*. 2018;88(1):1-16. DOI: [10.1007/s10971-018-4630-1](https://doi.org/10.1007/s10971-018-4630-1)
69. Hinton TJ, Jallerat Q, Palchesko RN, Park JH, Grodzicki MS, Shue HJ, et al. Three-dimensional printing of complex biological structures by freeform reversible embedding of suspended hydrogels. *Sci Adv*. 2015;1(9):e1500758. DOI: [10.1126/sciadv.1500758](https://doi.org/10.1126/sciadv.1500758) PMID: [26601312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26601312/)
70. Rocca M, Fragasso A, Liu W, Heinrich MA, Zhang YS. Embedded Multimaterial Extrusion Bioprinting. *SLAS Technol*. 2018;23(2):154-63. DOI: [10.1177/2472630317742071](https://doi.org/10.1177/2472630317742071) PMID: [29132232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29132232/)
71. Derby B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science*. 2012;338(6109):921-6. DOI: [10.1126/science.1226340](https://doi.org/10.1126/science.1226340) PMID: [23161993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23161993/)
72. Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater*. 2014;26(19):3124-30. DOI: [10.1002/adma.201305506](https://doi.org/10.1002/adma.201305506) PMID: [24550124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24550124/) ; 2014.
73. Huang Y, Zhang XF, Gao G, Yonezawa T, Cui X. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnol J*. 2017;12(8):1600734. DOI: [10.1002/biot.201600734](https://doi.org/10.1002/biot.201600734) PMID: [28675678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28675678/)
74. Nakamura M, Iwanaga S, Henmi C, Arai K, Nishiyama Y. Biomaterials and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *Biofabrication*. 2010;2(1):014110. DOI: [10.1088/1758-5082/2/1/014110](https://doi.org/10.1088/1758-5082/2/1/014110) PMID: [20811125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811125/)
75. Hoch E, Tovar GE, Borchers K. Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014;46(5):767-78. DOI: [10.1093/ejcts/ezu242](https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu242) PMID: [24970571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24970571/)
76. Yeo M, Lee JS, Chun W, Kim GH. An Innovative Collagen-Based Cell-Printing Method for Obtaining Human Adipose Stem Cell-Laden Structures Consisting of Core-Sheath Structures for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*. 2016;17(4):1365-75. DOI: [10.1021/acs.biomac.5b01764](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01764) PMID: [26998966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26998966/)
77. Liu W, Zhong Z, Hu N, Zhou Y, Maggio L, Miri AK, et al. Coaxial extrusion bioprinting of 3D microfibrillar constructs with cell-favorable gelatin methacryloyl microenvironments. *Biofabrication*. 2018;10(2):024102. DOI: [10.1088/1758-5090/aa9d44](https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa9d44) PMID: [29176035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29176035/)
78. Gao Q, He Y, Fu JZ, Liu A, Ma L. Coaxial nozzle-assisted 3D bioprinting with built-in microchannels for nutrients delivery. *Biomaterials*. 2015;61:203-15. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2015.05.031](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.031) PMID: [26004235](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26004235/)

79. Akkineni AR, Ahlfeld T, Lode A, Gelinsky M. A versatile method for combining different biopolymers in a core/shell fashion by 3D plotting to achieve mechanically robust constructs. *Biofabrication*. 2016;8(4):045001. DOI: [10.1088/1758-5090/8/4/045001](https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/4/045001) PMID: 27716641
80. Milojević M, Vihar B, Banović L, Miško M, Gradišnik L, Zidarič T, et al. Core/shell Printing Scaffolds For Tissue Engineering Of Tubular Structures. *J Vis Exp*. 2019(151):e59951. DOI: [10.3791/59951](https://doi.org/10.3791/59951) PMID: 31609306
81. Colosi C, Shin SR, Manoharan V, Massa S, Costantini M, Barbetta A, et al. Microfluidic Bioprinting of Heterogeneous 3D Tissue Constructs Using Low-Viscosity Bioink. *Adv Mater*. 2016(28):677-84. DOI: [10.1002/adma.201503310](https://doi.org/10.1002/adma.201503310) PMID: 26606883
82. Kim G, Ahn S, Kim Y, Cho Y, Chun W. Coaxial structured collagen–alginate scaffolds: fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. *J Mater Chem*. 2011;21(17):6165-72. DOI: [10.1039/c0jm03452e](https://doi.org/10.1039/c0jm03452e)
83. Luo Y, Lode A, Gelinsky M. Direct plotting of three-dimensional hollow fiber scaffolds based on concentrated alginate pastes for tissue engineering. *Adv Healthc Mater*. 2013;2(6):777-83. DOI: [10.1002/adhm.201200303](https://doi.org/10.1002/adhm.201200303) PMID: 23184455
84. Markstedt K, Mantas A, Tournier I, Martínez Ávila H, Hägg D, Gatenholm P. Martínez Ávila Hc, Hägg D, Gatenholm P. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*. 2015;16(5):1489-96. DOI: [10.1021/acs.biomac.5b00188](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00188) PMID: 25806996
85. Dolenšek J, Pohorec V, Rupnik MS, Stožer A. Pancreas Physiology. In: Seicean A, ed. *Challenges in Pancreatic Pathology*. London: IntechOpen Limited; 20017. DOI: [10.5772/65895](https://doi.org/10.5772/65895)
86. Marciniak A, Cohrs CM, Tsata V, Chouinard JA, Selck C, Stertmann J, et al. Using pancreas tissue slices for in situ studies of islet of Langerhans and acinar cell biology. *Nat Protoc*. 2014;9(12):2809-22. DOI: [10.1038/nprot.2014.195](https://doi.org/10.1038/nprot.2014.195) PMID: 25393778
87. Marciniak A, Selck C, Friedrich B, Speier S. Mouse pancreas tissue slice culture facilitates long-term studies of exocrine and endocrine cell physiology in situ. *PLoS One*. 2013;8(11):e78706. DOI: [10.1371/journal.pone.0078706](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078706) PMID: 24223842
88. Speier S. Experimental approaches for high-resolution in vivo imaging of islet of Langerhans biology. *Curr Diab Rep*. 2011;11(5):420-5. DOI: [10.1007/s11892-011-0207-x](https://doi.org/10.1007/s11892-011-0207-x) PMID: 21701794
89. Speier S, Rupnik M. A novel approach to in situ characterization of pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch*. 2003;446(5):553-8. DOI: [10.1007/s00424-003-1097-9](https://doi.org/10.1007/s00424-003-1097-9) PMID: 12774232
90. Cohrs CM, Chen C, Jahn SR, Stertmann J, Chmelova H, Weitz J, et al. Vessel Network Architecture of Adult Human Islets Promotes Distinct Cell-Cell Interactions In Situ and Is Altered After Transplantation. *Endocrinology*. 2017;158(5):1373-85. DOI: [10.1210/en.2016-1184](https://doi.org/10.1210/en.2016-1184) PMID: 28324008
91. Weitz JR, Makhmutova M, Almaça J, Stertmann J, Aamodt K, Brissova M, et al. Mouse pancreatic islet macrophages use locally released ATP to monitor beta cell activity. *Diabetologia*. 2017. PMID: 28884198
92. Meneghel-Rozzo T, Rozzo A, Poppi L, Rupnik M. In vivo and in vitro development of mouse pancreatic beta-cells in organotypic slices. *Cell Tissue Res*. 2004;316(3):295-303. DOI: [10.1007/s00441-004-0886-6](https://doi.org/10.1007/s00441-004-0886-6) PMID: 15085425
93. Dolenšek J, Stožer A, Skelin Klemen M, Miller EW, Slak Rupnik M. The relationship between membrane potential and calcium dynamics in glucose-stimulated beta cell syncytium in acute mouse pancreas tissue slices. *PLoS One*. 2013;8(12):e82374. DOI: [10.1371/journal.pone.0082374](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082374) PMID: 24324777
94. Stožer A, Dolenšek J, Rupnik MS. Glucose-stimulated calcium dynamics in islets of Langerhans in acute mouse pancreas tissue slices. *PLoS One*. 2013;8(1):e54638. DOI: [10.1371/journal.pone.0054638](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054638) PMID: 23358454
95. Dolenšek J, Špelič D, Klemen MS, Žalik B, Gosak M, Rupnik MS, et al. Membrane Potential and Calcium Dynamics in Beta Cells from Mouse Pancreas Tissue Slices: Theory, Experimentation, and Analysis. *Sensors (Basel)*. 2015;15(11):27393-419. DOI: [10.3390/s151127393](https://doi.org/10.3390/s151127393) PMID: 26516866
96. Skelin Klemen M, Dolenšek J, Stožer A, Rupnik M. Measuring Exocytosis in Endocrine Tissue Slices. In: Thorn P, ed. *Exocytosis Methods*. Humana Press; pp. 127-46. DOI: [10.1007/978-1-62703-676-4_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-676-4_7)
97. Skelin M, Rupnik M. cAMP increases the sensitivity of exocytosis to Ca²⁺ primarily through protein kinase A in mouse pancreatic beta cells. *Cell Calcium*. 2011;49(2):89-99. DOI: [10.1016/j.ceca.2010.12.005](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.12.005) PMID: 21242000
98. Dolenšek J, Skelin M, Rupnik MS. Calcium dependencies of regulated exocytosis in different endocrine cells. *Physiol Res*. 2011;60:S29-38. DOI: [10.33549/physiolres.932176](https://doi.org/10.33549/physiolres.932176) PMID: 21777026
99. Stozer A, Dolensek J, Skelin M, Rupnik M. Cell physiology in tissue slices: studying beta cells in the islets of Langerhans = Celicna fiziologija v tkivnih rezinah: preucevanje celic beta v Langerhansovih otockih. *Acta medico-biotechnica*. 2013;6(1):20-32.
100. Markovič R, Stožer A, Gosak M, Dolenšek J, Marhl M, Rupnik MS. Progressive glucose stimulation of islet beta cells reveals a transition from segregated to integrated modular functional connectivity patterns. *Sci Rep*. 2015;5(1):7845. DOI: [10.1038/srep07845](https://doi.org/10.1038/srep07845) PMID: 25598507

101. Gosak M, Stožer A, Markovič R, Dolenšek J, Perc M, Rupnik MS, et al. Critical and Supercritical Spatiotemporal Calcium Dynamics in Beta Cells. *Front Physiol.* 2017;8(1106):1106. DOI: [10.3389/fphys.2017.01106](https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01106) PMID: [29312008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29312008/)
102. Stožer A, Gosak M, Dolenšek J, Perc M, Marhl M, Rupnik MS, et al. Functional connectivity in islets of Langerhans from mouse pancreas tissue slices. *PLOS Comput Biol.* 2013;9(2):e1002923. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1002923](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002923) PMID: [23468610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23468610/)
103. Huang YC, Rupnik M, Gaisano HY. Unperturbed islet α -cell function examined in mouse pancreas tissue slices. *J Physiol.* 2011;589(Pt 2):395-408. DOI: [10.1113/jphysiol.2010.200345](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.200345) PMID: [21078586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21078586/)
104. Huang YC, Rupnik MS, Karimian N, Herrera PL, Gilon P, Feng ZP, et al. In situ electrophysiological examination of pancreatic α cells in the streptozotocin-induced diabetes model, revealing the cellular basis of glucagon hypersecretion. *Diabetes.* 2013;62(2):519-30. DOI: [10.2337/db11-0786](https://doi.org/10.2337/db11-0786) PMID: [23043159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23043159/)
105. Low LA, Tagle DA. Tissue chips - innovative tools for drug development and disease modeling. *Lab Chip.* 2017;17(18):3026-36. DOI: [10.1039/C7LC00462A](https://doi.org/10.1039/C7LC00462A) PMID: [28795174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28795174/)
106. Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJ, Whitesides GM. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Anal Chem.* 1998;70(23):4974-84. DOI: [10.1021/ac980656z](https://doi.org/10.1021/ac980656z) PMID: [21644679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21644679/)
107. Takebe T, Zhang B, Radisic M. Synergistic engineering: organoids meet organs-on-a-chip. *Cell Stem Cell.* 2017;21(3):297-300. DOI: [10.1016/j.stem.2017.08.016](https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.016) PMID: [28886364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886364/)
108. Sankar KS, Green BJ, Crocker AR, Verity JE, Altamentova SM, Rocheleau JV. Culturing pancreatic islets in microfluidic flow enhances morphology of the associated endothelial cells. *PLoS One.* 2011;6(9):e24904. DOI: [10.1371/journal.pone.0024904](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024904) PMID: [21961048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21961048/)
109. Silva PN, Green BJ, Altamentova SM, Rocheleau JV. A microfluidic device designed to induce media flow throughout pancreatic islets while limiting shear-induced damage. *Lab Chip.* 2013;13(22):4374-84. DOI: [10.1039/c3lc50680k](https://doi.org/10.1039/c3lc50680k) PMID: [24056576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24056576/)
110. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):760-72. DOI: [10.1038/nbt.2989](https://doi.org/10.1038/nbt.2989) PMID: [25093883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25093883/)