

A háromdimenziós *in vitro* tumormodellek jelentősége a rákkutatásban és diagnosztikában

Alföldi Róbert, Szebeni Gábor János, Puskás László G.

AVIDIN Kutató Fejlesztő és Kereskedelmi Kft., Szeged

A tumorelles hatóanyagok in vitro tesztelése humán daganatos sejteken nélkülözhetetlenné vált a gyógyszerkutatásban és a klinikumban. Habár e célra a kétdimenziós sejtnövesztés terjedt el széleskörűen, az új, háromdimenziós sejtenyésztési módszerek egyre nagyobb teret hódítanak meg, mivel szerkezetük és összetettségük közelebb áll a valós tumor-mikrokörnyezethez. Munkánk célja a leginkább használt in vitro háromdimenziós tumormodellek bemutatása volt, valamint a RAFT™ háromdimenziós in vitro tumorsejtmodell összehasonlítása a hagyományos kétdimenziós tumorsejttenyésztetekkel. Vizsgálataink során összehasonlítottuk a különböző tenyésztési körülmények között növesztett A549 humán tüdőkarcinóma-sejtek életképességét, enzimaktivitását. Eredményeink azt mutatták, hogy míg a hosszabb tenyésztési időtartam alatt a RAFT™ háromdimenziós in vitro tumorsejtmodellben a nekrotikus sejtek száma jelentősen megnőtt, addig a konvencionális hatóanyag-tesztelés időtartamán belül (3–5 nap) jelentős különbséget nem tapasztaltunk a hagyományos kétdimenziós sejtenyésztetekkel összehasonlítva. A RAFT™ módszerrel növesztett tumorsejtszigetek szerkezete sokkal összetettebb, mint a hagyományos kétdimenziós tenyésztetek esetén, így – az in vivo tumor-mikrokörnyezethez hasonlóan – itt is jelen van az extracelluláris térben található kollagénhálózat, amely nagyban befolyásolhatja a hatóanyagok sejtekhez való diffundálását, ahhoz hasonlóan, ahogyan az élő szervezetben is történik. Következtetésként elmondható, hogy a hagyományos kétdimenziós in vitro hatóanyag-vizsgálatoknak fontos kiegészítője lehet a hatóanyagok háromdimenziós kultúrában növesztett tumorsejteken végzett tesztelése is, amely segítségével a kapott eredmények könnyebben interpretálhatók mind az in vivo vizsgálatok, mind a diagnosztika, illetve terápia során. Magyar Onkológia 59:303–309, 2015

Kulcsszavak: A549 tüdőkarcinóma, háromdimenziós tumormodell, RAFT™, életképesség, tumor-mikrokörnyezet

In vitro testing of antitumor agents on human cancer cell lines has become essential in pharmaceutical research and in clinical practice. Although the most widely used technique is the two-dimensional cell growing protocol (in tissue culture plates), the new three-dimensional methods are becoming more and more popular as their structure and complexity is more similar to the microenvironment of the real tumor. The aim of the present study is to describe the most widely used in vitro three-dimensional tumor models and to compare a RAFT™ three dimensional in vitro tumor model with the traditional two-dimensional tumor cell cultures. In the study, the viability and the enzyme activity of cultured A549 non-small cell lung cancer (NSCLC) cells under different conditions were compared. The results show that while the number of necrotic cells increased significantly (20-fold; 2D/A549 T75 conventional tissue culture flask 1.6%; 2D/A549-collagen coated T75 tissue culture flask 1.45%, RAFT™ 22.11%) during long culturing period in the RAFT™ three-dimensional in vitro tumor model, there was no significant difference during the conventional antitumor screening period (3-5 day) compared to the traditional two-dimensional cell cultures. The structure of the tumor cell islets grown with RAFT™ is much more complex than that of the traditional two-dimensional cultures. Thus, similarly to the in vivo tumor microenvironment, there is also a collagen matrix in the extracellular space which can have significant effect on the diffusion of the antitumor agents to cells. In conclusion, it can be stated that testing of antitumor agents on tumor cells cultured in three-dimensional systems can be an important complementary method to the traditional two-dimensional in vitro analyses. The results of the new three-dimensional method can be more easily applied in the in vivo analysis and translated into clinical practice.

Alföldi R, Szebeni GJ, Puskás LG. The potential of three-dimensional tumor models and cell culturing in cancer research and diagnostics. Hungarian Oncology 59:303–309, 2015

Keywords: A549 non-small cell lung cancer, *in vitro* three-dimensional tumor models, RAFT™, viability, tumor microenvironment

Levelezési cím: Alföldi Róbert, AVIDIN Kutató Fejlesztő és Kereskedelmi Kft. 6726 Szeged, Alsó kikötő sor 11.

Tel.: +36 70 4063192, e-mail: r.alfoldi@avidinbiotech.com

Közlésre érkezett: 2015. június 19. • Elfogadva: 2015. július 15.

BEVEZETÉS

Magyarországon a vezető halálokok listájának élén a nem fertőző megbetegedések állnak. Ezek közül is első helyen találhatóak a szív- és érrendszeri betegségek, több mint az esetek 45%-ában, majd ezt követik a daganatos megbetegedések, több mint 25%-os gyakorisággal. Így felesleges hangsúlyozni, hogy miért fontos olyan *in vitro* modellrendszereket kidolgozni, amelyek a daganatos megbetegedések elleni új hatóanyagokat képesek a tumorsejteken azok szűk mikrokörnyezetével együtt vizsgálni, mind rövid, mind pedig hosszú távon. Az általánosságban alkalmazott ún. monolayer sejtkultúrák számos hátránnyal rendelkeznek, mivel a mesterségesen kialakított, egy sejtrétegben növekvő sejtek polaritásukat elveszítik, így biológiai relevanciájuk, valamint a tesztelt hatóanyagok klinikai hatékonysága nehezen megjósolható és adaptálható a klinikai kutatásokba és a terápiába. Annak ellenére, hogy több tanulmány is bizonyította már, hogy a két dimenzióban növesztett sejtek hatóanyag elleni érzékenysége nagyobb, mint a három dimenzióban növesztett sejteké (1–3), mégis a kétdimenziós sejtenyésztés az általánosan elterjedt módszer a rákkutatásban és a diagnosztikában (4–6). Bár a jelölésmentes eljárások új lehetőségeket és kutatási irányokat adtak a kétdimenziós vizsgálatoknak, mint amilyen a vezetőképeség alapuló, valós idejű sejtelemező rendszer (7, 8) vagy a holografikus mikroszkópia (8, 9), hasonló megoldások jósolhatók a háromdimenziós kultúrák esetében is.

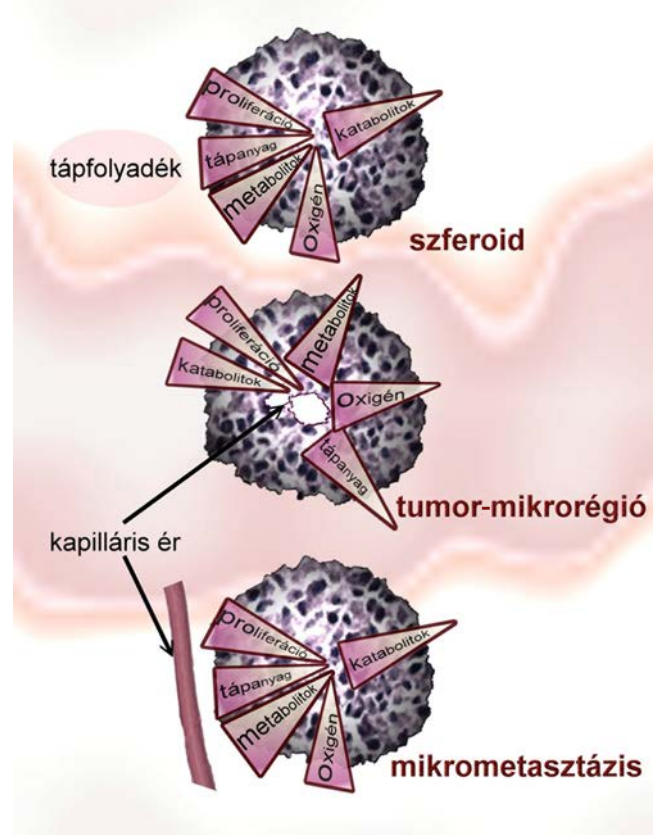
A háromdimenziós sejtenyésztési módszerek egyik legfontosabb előnye, hogy míg a kétdimenziós tenyésztés folyamán a sejtek többnyire csak egy rétegben helyezkednek el a tenyésztési felületen, aminek következtében a polaritásukat elvesztik, addig a háromdimenziós módszereknél a sejtek képesek több rétegben növekedni, valamint ennek eredményeképpen polaritásuk is megmarad. Ez nem csak morfológiai különbségeket eredményez, hanem metabolikus folyamataik sem szenvednek a hagyományos sejtenyésztésnek betudható változást. Mivel a fiziológiás környezethez hasonlóan a különböző rétegekben elhelyezkedő sejtek különböző mértékben jutnak tápanyaghoz, valamint oxigénhez, sokkal jobban modellezhetők vele az élő szövetben megtalálható avaszkularizált daganatos sejtcsoportosulások. A háromdimenziós tumormodellek így lényegében mikrometasztázisoknak feleltethetőek meg.

A háromdimenziós sejtnövesztési technikák több típusra csoportosíthatók, melyek közül a legelterjedtebb és leginkább vizsgált módszer a tumorszferoid módszer, de ezenkívül számos egyéb módszerrel is találkozhatunk, például a különböző extracelluláris mátrix fehérjékkel borított mikrohordozókon való sejtnövesztés vagy a kollagéngátyában való sejtnövesztés módszere.

Multicelluláris tumorszferoidok

A tumorszferoidok előállítására az *in vitro* háromdimenziós szövettenyésztés egyik alappillérenek számító módszer, amelyet az elmúlt évtizedekben pontosan leírtak és optimalizáltak (10, 11). Tumorfiziológiai szempontból képesek vagyunk ennek a módszernek a segítségével olyan tumorokat előállítani, amelyek tápanyagellátásukban és paramétereikben egy avaszkularizált vagy intervaskularizált szilárd tumorhoz hasonlítanak. A multicelluláris tumorszferoidoknál megfigyelhetők a gyors osztódásban lévő külső sejtrétegek és egy hipoxiás környezetben lévő apoptotikus és/vagy nekrotikus mag. Acker és munkatársai 1987-es, majd 1988-as tanulmányukban már jól jellemezték, hogy a növekvő szferoidok esetében a központi régió elsavasodása figyelhető meg, mivel a szferoid átmérőjének (amely akár a 600–700 μm -t is elérheti) növekedésével arányosan, a központi régió parciális oxigénszintje lecsökken, ami később

1. ábra. A multicelluláris tumorszferoidot (fent) hasonló mikrokörnyezet veszi körül, mint egy avaszkularizált mikrometasztázist (alul), valamint ellentétes tápanyag- és metabolitgradiensek jellemzik, mint egy kapilláris által körbeölelt tumor-mikrorégiót (középen)

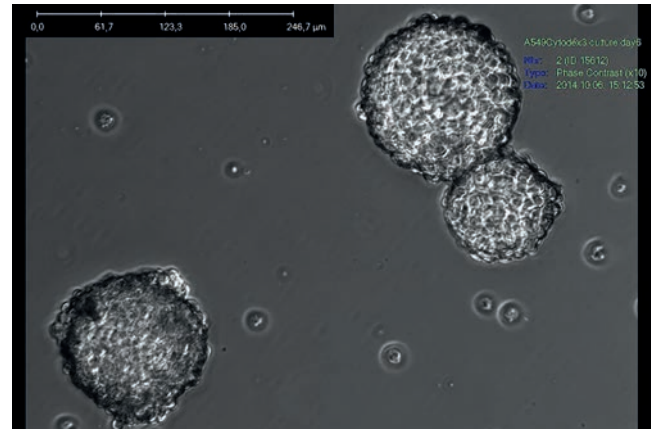


egy nekrotikus mag kialakulásához vezet (12, 13). Ezt a folyamatot, valamint a tápanyagok, a katabolitok és a metabolitok eloszlását ezután Juergen Friedrich és munkatársai is tovább jellemezték. Kimutatták, hogy a multicelluláris tumorszferoidoknál a tápanyagok egy gradiens mentén oszlanak meg sugárirányban, de fordított gradiens mentén, mint egy kapillárist körbeölelő *in vivo* daganat esetén (1. ábra) (6). A multicelluláris tumorszferoidok kialakítására szolgáló legtöbbet használt módszer a „hanging drop” módszer (14, 15), ahol a szferoidok egy speciálisan erre a célra kialakított tenyésztőlemez felületén, a gravitációs erőt kihasználva egy-egy cseppben fejlődnek és formálódnak háromdimenziós struktúrává. A módszer előnye a robusztussága, valamint ismételhetősége, viszont nem elhanyagolható hátrányai közé tartozik az, hogy néhány száz mikrométer átmérő felett a szferoidok központi régiója nekrotikusan elhal (12, 13, 15), így hosszú távú gyógyszerhatás rajtuk nehezen vizsgálható. A rajtuk végzett tápoldatcsere és hatóanyag-kezelés is technikailag nehezen kivitelezhető, így nagy mennyiségben való előállításuk és a tumorelleses szerek rajtuk végzett tesztelése idő- és munkaigényes.

Mesterséges hordozón kialakított háromdimenziós tumormodellek

A mikrohordozó polimerek felületén való háromdimenziós tumorsejtnövesztés számos előnnyel bír. Segítségével a kitapadó sejtek folyadékkultúrában is szaporíthatóak, egyedileg kialakított bioreaktorokban. A rendszer legnagyobb előnye a hagyományos multicelluláris tumorszferoidokhoz képest, hogy lehetőség adódik nagyszámú tumorsejt-csoportosulást egyszerre felnöveszteni nagy sejtsűrűség mellett, egy egyedileg kialakított szaporítóedényben. Számos tanulmány foglalkozott már a különböző sejtípusok mesterségesen kialakított mikrohordozón (mikrogyöngyön) való tenyésztésével (3, 16), de egy 2011-ben a Hamilton cég által fejlesztett eszköz segítségével (BioLevigator™) a különböző sejtípusok háromdimenziós növesztése viszonylag egyszerűvé vált egy egyedileg kialakított asztali inkubátor és speciális tenyésztőcsövek használatával (17–19). A mikrohordozókra kitapadó sejtek növekedése három dimenzióban történik, számos lebegő multicelluláris tumorsejt-csoportosulást kialakítva (2. ábra). A multicelluláris tumorsejt-csoportosulások kialakítására oly módon alkalmas a rendszer, hogy az egyedileg kialakított tenyésztőcsövekben lévő lapátok (LeviTube™, Hamilton, Svájc) biztosítják a sejtek állandó lebegtetését a folyadékoszlopban, így a sejtek képesek egyénileg, minden egyes gyöngy felületén további sejtrétegeket kialakítani, ezzel egy komplex multicelluláris tumort létrehozva. A módszer lehetővé teszi, hogy nagyszámú sejtet egyidejűleg tudjunk tenyészteni egy-egy reakciócsőben, valamint azt, hogy *in vivo* xenograft állatkísérletekben közvetlenül használni

2. ábra. Cytodex 3 (Sigma-Aldrich, Magyarország) felületén növesztett háromdimenziós A549 humán tüdőcarcinóma mikroszkópos képe



tudjuk a kinyert háromdimenziós tumorokat. Ez annak köszönhető, hogy a mikrohordozók többsége biodegradábilis és biokompatibilis, azaz nem szükséges emésztési lépésnek kitenni a sejteket, amelynek során a sejtheadhéziós fehérjék sérülnének. A mikrohordozón való tumornövesztés további előnye, hogy elérhetővé váltak olyan mikrohordozók is (GEM™, Global Cell Solution, Egyesült Államok), amelyek a magjukban mágnesezhető partikulumokat tartalmaznak, így a tápoldatcsere alkalmával nem szükséges a centrifugálás során fellépő centrifugális erőnek kitenni a sejteket, hanem elegendő egy mágnes segítségével a cső aljára gyűjteni őket.

Kollagénbázisú háromdimenziós tumormodellek

Mivel a háromdimenziós tumormodelleknek utánozniuk kell a daganatos sejteket körbeölelő extracelluláris teret is, ennek céljából olyan kollagén-hidrogél korongba ágyazott daganatos sejtek hozhatók létre a TapBiosystems által fejlesztett RAFT™ (Real Architecture for 3D Tissue) készlettel, amelyek vastagsága 100–120 μm (20, 21). A rendszer biomimetikus volta abban rejlik, hogy a neutralizált kollagénmátrixba ágyazott sejtek felszínére helyezett steril abszorbens hengerek segítségével a kollagén-hidrogél mátrix a fiziológiai kollagén térfogatszázalékkal azonos sűrűségűre préselhető (8–10% w/v). Így az említett háromdimenziós tumormodellek közül a RAFT™ módszer képes legéletszerűbben utánozni az *in vivo* tumorok valós mikrokozmoszát. A kollagénmátrixba ágyazott sejtek extracelluláris környezete, valamint a sejtek migrációjában jelentős szerepet játszó realiztikus extracelluláris mátrix sűrűség is jól modellezett ebben a rendszerben. A kollagénbázisú háromdimenziós tumormodellel így akár más sejtekkel való együttes növesztéssel, ún. ko-kultúrában, közel *in vivo*-szerű tumorszövetet lehet *in vitro* előállítani.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A549 sejt vonal

Az A549 humán nem kissejtes tüdőcarcinóma-sejtvonalat az ATCC-től vásároltuk (ATCC, USA), majd 95% páratartalom és 5% CO₂ mellett 37 °C fokon szaporítottuk fel, standard sejtenyésztési körülmények között 4,5 g/l glükóztartalmú DMEM/F12 (DMEM, PAN™ Biotech; F12 Nut mix, Gibco, Life Technologies) tápoldatban 10% borjuszérum (FBS, Gibco, Life Technologies), 1×GlutaMAX™ (Gibco, Life Technologies), valamint 1% Pen/Strep antibiotikum (Penicillin G sodium salt, and Streptomycin sulfate salt, Sigma-Aldrich Co.) tartalommal.

Kétdimenziós sejtenyésztés

A kétdimenziós sejtenyésztések T-75 sejtenyésztő flakákban (Primo® TC flask 75 cm², EuroClone S.p.A, Italy), valamint 96 lyukú mikrotiter tenyésztőlemezen (Tissue Culture Plates-96 Wells, Flat bottom, Orange Scientific) történtek standard tenyésztési körülmények között. A felhasznált sejtenyésztő mikrotiterlemezek, valamint a T-75 sejtenyésztő flakák (2D-hagyományos sejtenyésztő T75 flaska = 2D/A549-TC) egy csoportját előzőleg 0,1% I-es típusú kollagénnel (Collagen Type I, C3867, Sigma-Aldrich, Magyarország) kezeltük (2D/A549-kollagénsel).

Élősejt-szám meghatározása tripánkékfestéssel

A sejtek életképességét, azaz a sejtmembrán sértetlenségét 1:1 arányú 0,4% tripánkéfkoldattal (T8154, Sigma-Aldrich, Magyarország) vizsgáltuk. A sejtek életképességét a tenyésztőfelületről való leemésztésük, majd mosásuk után közvetlenül meghatároztuk, majd az élő sejtek számát százalékban kifejeztük.

A sejtek életképességének meghatározása resazurin alapú enzimaktivitásméréssel

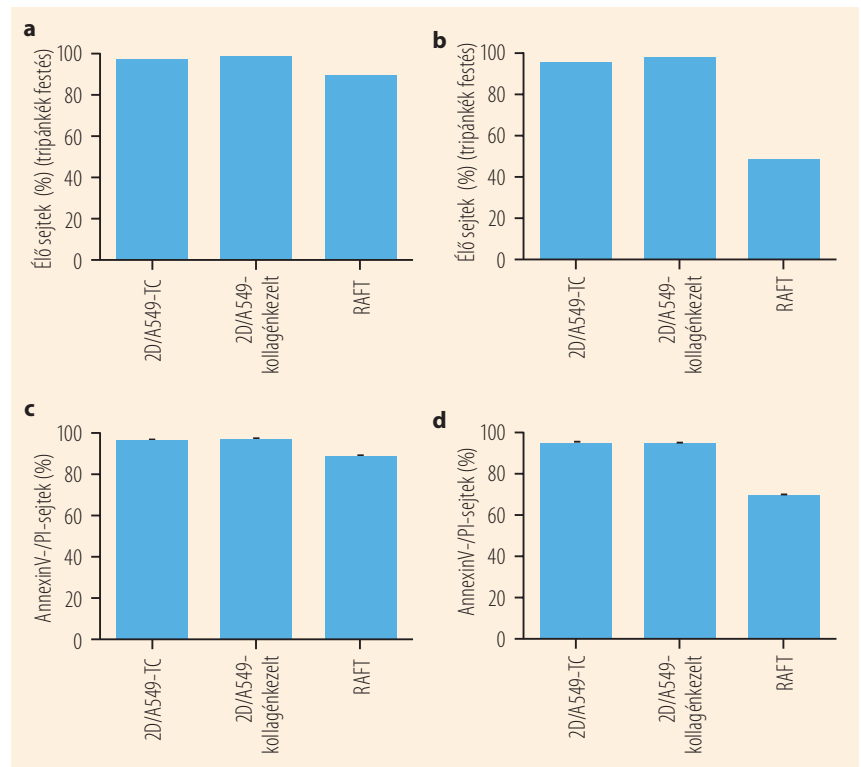
A sejtek életképességét 10 napon át az élő sejtek enzimaktivitásán alapuló resazurin- (R7017n Sigma-Aldrich, Magyarország) próbával határoztuk meg. Az enzimreakció a resazurin redukcióján keresztül narancs-fluoreszcens resorufin képződéséhez vezet, amely fluoriméterrel detektálható és a relatív fluoreszcencia (RFU) meghatározható.

A 0,15 mg/ml-es töménységű reakcióoldatot 1:5 arányú hígításban tettük a sejtek tenyésztőoldatához, majd 37 °C-on két órán át inkubáltuk. A keletkező resorufin mennyiségét CytoFluor Series4000 Multi-Well Plate Reader (PerSeptive Biosystems, USA) segítségével 530 nm excitációs és 580 nm emisszós hullámhossz mellett detektáltuk.

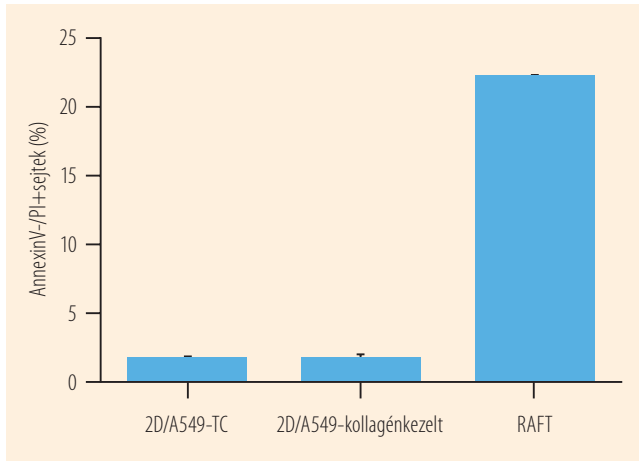
Áramlási citometriai vizsgálatok

A különböző tenyésztési feltételek mellett növesztett sejteket felemésztettük Accutase™ (Corning, Egyesült Államok) enzimmel a szövettenyésztő flaska felszínéről, valamint a RAFT™ esetében kollagén-hidrogél vázból, majd Annexin V-kötő pufferbe szuszpendáltuk (0,14 M NaCl, 0,01 M HEPES, 2,5 mM CaCl₂). Ezután a sejtekhez Annexin V-Alexa Fluor™ 488-at (Life Technologies, 2,5:100) adtunk, és 15 percre fénytől védve, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Mérés előtt propidium-jodiddal (PI, Sigma-Aldrich, 10 µg/ml) tettük pontosabbá az élő sejtek elkülönítését. Mosás után a sejteket FACSCalibur cytofluoriméter (Becton Dickinson) segítségével vizsgáltuk. Az FL1- (Annexin V-Alexa Fluor™ 488) és FL3- (PI) negatív, élő sejtek, az FL1-pozitív és FL3-negatív, korai apoptotikus sejtek, FL1-negatív

3. ábra. Az élő sejtek számának meghatározása Bürker-kamra segítségével 72 óránál (a) és 240 óránál (b), valamint a sejtek életképességének a meghatározása kvantitatív módon Annexin V/PI festéssel, szintén a 72. (c) és 240. óránál (d)



4. ábra. A nekrotikus sejtek 240. óránál kvantitatív módon meghatározott százalékos arányából jól látszik a RAFT™ háromdimenziós modellben lévő tumorsejtek megemelkedett nekrozisa



és FL3-pozitív nekrotikus sejtek, valamint az FL1-pozitív és FL3-pozitív késői apoptotikus sejtek eloszlási százalékát határoztuk meg.

Konfokális lézer szkennning mikroszkópia

A sejteket (4000/lyuk) gyári és általunk 0,1% patkány I-es típusú kollagénnel előkezelte 96 lyukú sejtenyészte edényre ültettük ki, valamint a RAFT™ korongokat a gyártó (TAP Biosystems, Royston, UK) utasítása szerint elkészítettük és 37 °C-on 5% CO₂ mellett 72 órán, valamint 240 órán át inkubáltuk. A mintákat PBS-sel mostuk és calceinkötő pufferben (1,2 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ PBS-ben oldva) 1 μM calcein-violával (Life Technologies, Invitrogen, Molecular Probes) sejtenyészte termosztátban 30 percet inkubáltuk. A mintákat Annexin V-kötő pufferrel mostuk és Annexin V-Alexa Fluor™ 488-cal (Life Technologies, 2,5:100) 15 percet fénytől védve, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a mikroszkópos vizsgálat (Olympus FV-1000) előtt 10 μg/ml propidium-jodiddal tettük pontosabbá az élő sejtek elkülönítését (Fluoview szoftver).

EREDMÉNYEK

Kvantitatív életképesség-meghatározás

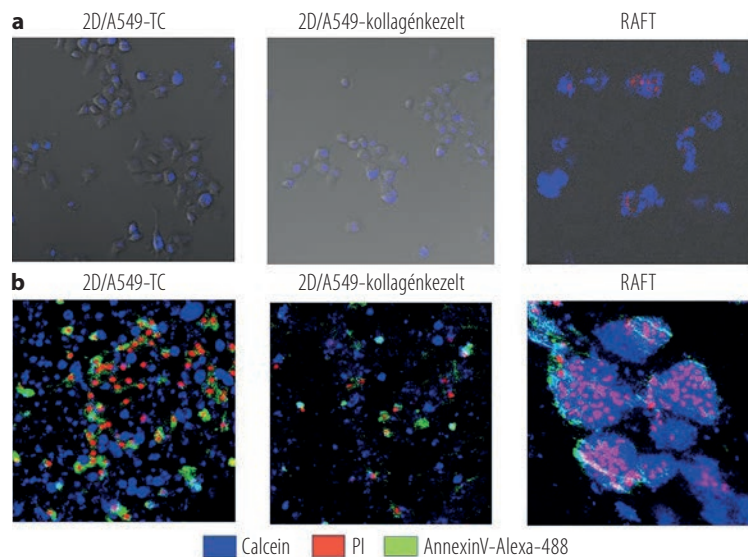
Vizsgálataink során 72 óra után és a kísérleti szakasz utolsó napján, azaz a 240. órában az élő tumorsejtek számát tripánkéfestéssel és áramlási citofluorimetriás mérésekkel (az Annexin

V-pozitív apoptotikus és PI-pozitív nekrotikus sejteket „ki-kapuzva”) is meghatároztuk. Tripánkékes számolással a 72. órában a kétdimenziós tenyésztési módszerek esetében az élő tumorsejtek száma több mint 95% volt, a háromdimenziós RAFT™ esetében pedig kissé kevesebb, 89,5% (3.a ábra). Az áramlási citofluorimetriás mérésekben szintén 95% körül volt az élő sejtek aránya a kétdimenziós kultúrákban, míg ez az érték a RAFT™ 3D kollagénmátrixban 87,6% volt (3.c ábra). Jelentősen nem változott a sejtek életképessége a kétdimenziós tenyésztési körülmények között a kísérletsorozat végére, tripánkékes számolással és áramlási citofluorimetriás méréssel szintén 95% körül volt, azonban a RAFT™ háromdimenziós modellben már átlagosan 60%-ra csökkent (48,15%) (3.b és 3.d ábra). A 240 órás tenyésztési ciklus végén a PI-pozitív sejteket is kvantitálva a kétdimenziós kultúrákban jelentős mértékű nekrozis nem volt detektálható (2D/A549-TC: 1,6%; 2D/A549-kollagénkezelte: 1,45%), míg a RAFT™ háromdimenziós kollagénmátrixban növesztett tumorsejteknél ez az érték 22,11%-ra emelkedett (4. ábra).

Konfokális lézer szkennning mikroszkópia

A sejtek életképességét calcein segítségével vizualizáltuk, melynek során a calcein nem fluoreszkáló lipofil észter-származékát (Calcein-AM) adtuk hozzá a sejtekhez, melyet az élő sejtek citoplazmatikus észterázai fluoreszcens calceinné hasítanak. Az apoptotikus, ill. nekrotikus sejtek elkülönítésére Annexin V- és PI-festést alkalmaz-

5. ábra. A sejtek életképességét különböző sejtenyészte körülmények (2D/A549-TC, 2D/A549-kollagénkezelte, RAFT™ 3D kollagénbe ágyazott) között calcein-, Annexin V-, propidium-jodid-festéssel vizualizáltuk 72 óra után (a) és 240 óra után (b)



■ Calcein ■ PI ■ Annexin V-Alexa-488

tunk. A klasszikus tripánkékes sejtszámolással és az áramlási citofluorimetriás mérésekkel összhangban a sejttenyésztő edényekben volt a legmagasabb az élő sejtek száma. A RAFT™ 3D kollagénmátrixban jól kivehetőek a sejtcsoportok, a primer tumorokhoz hasonlóan, ezekben a kollagénbe ágyazott sejtaggregátumokban is az oxigén- és tápanyagellátás passzív diffúzióval valósul meg, melynek a hatásfoka a sejtcsoport méretének növekedésével arányosan csökken. Ennek megfelelően a RAFT™ 3D mintákban láthattuk a legtöbb halódó sejtet mindkét időpontban (5. ábra).

Resazurin mérésén alapuló enzimaktivitás

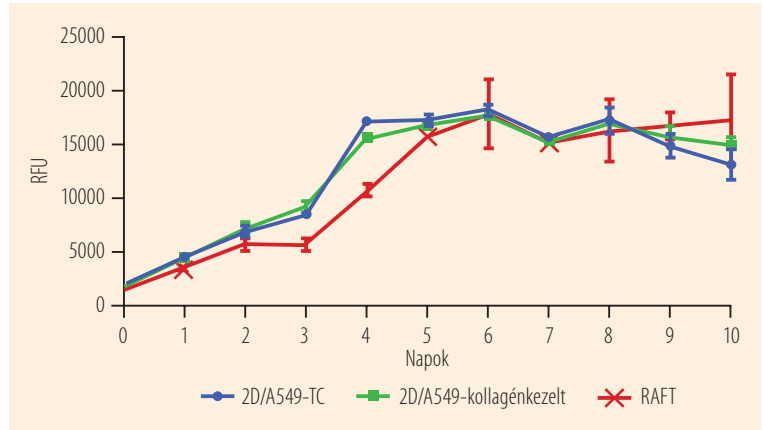
A resazurin redukciója folyamán keletkező resorufin képződésének vizsgálatával kvantitatív képet kapunk az osztódó sejtek életképességéről, valamint az sejtek enzimaktivitásáról. A naponta elvégzett mérések relatív fluoreszcenciájából (RFU) pedig kirajzolódik a sejtek szaporodási görbéje, amely alapján meghatározható, hogy a sejtek mikor érték el az exponenciális fázis végét, valamint mikor lépnek át a stationárius fázisba. Az enzimaktivitáson alapuló méréseinken látszik, hogy míg a kétdimenziós tenyészetek (2D/A549-TC, 2D/A549-kollagénkezelt) a tenyésztés negyedik napján elérik az enzimaktivitásuk maximumát, addig a háromdimenziós tenyészet (RAFT™) két nappal később, a hatodik napon éri el ugyanezt (6. ábra).

MEGBESZÉLÉS

A munkánk fő célja az volt, hogy szemléltessük az új tumorelles hatóanyagok tesztelésében jelenleg használt *in vitro* háromdimenziós tumormodelleket, valamint, hogy összehasonlítsunk egy új, még kevésbé jellemzett háromdimenziós tumormodellt (RAFT™) a széleskörűen használt kétdimenziós tumorsejttenyészetekkel A549 tüdőkarinóma-sejtek felhasználásával. Az összehasonlítás fő fókuszja az volt, hogy megvizsgáljuk, tapasztalható-e különbség az A549 sejtek életképességében, valamint hogy befolyásolja-e a különböző tenyésztési körülmény a sejtek osztódási sebességét.

Az általunk használt sejt-életképességi vizsgálatok alapján (tripánkéfestés, áramlási citometriai vizsgálatok) kijelenthetjük, hogy a RAFT™ háromdimenziós tumorsejttenyészetek életképessége jelentős különbséget nem mutatott a tenyésztés korai szakaszában (72 óra), viszont 240 óra tenyésztés után, míg a kétdimenziós tenyészetek életképessége megmaradt, addig a háromdimenziós tenyészetnél lecsökkent. Összevetve a két időpontban (72 és 240 óra) mért

6. ábra. A resazurin naponta mért enzimaktivitásán alapuló módszer segítségével számolt relatív fluoreszcencia (RFU) alapján látható, hogy míg a kétdimenziós tenyészetek a negyedik napon elérték enzimaktivitásuk maximumát, addig a RAFT™ a hatodik napon



értékeket és a tenyészetek (a tanulmányban nem szemléltetett) mikroszkópos képeit, arra következtettünk, hogy a kétdimenziós tenyészetek életképessége azért nem változott a tenyésztés folyamán, mert miután elérték 100%-os konfluenciájukat (körülbelül az 5. napon), bár osztódási sebességük lecsökkent, tápanyagfelvételük ugyanolyan mértékben folytatódott, mint kisebb konfluencia esetén, mivel minden sejt számára hozzáférhető maradt mind a tápanyag, mind az oxigén. A háromdimenziós RAFT™ esetben pedig a háromdimenziósan növekvő sejtek belső sejtrétegei kevesebb tápanyaghoz és oxigénhez juthattak, hasonlóan az előzőleg már multicelluláris tumorszferoidok esetében leírtakhoz (12), így kialakult bennük egy nekrotikus mag, hasonlóan az *in vivo* avaskularizált tumorokhoz. Az elméletünket a nekrotikus sejteknek a 240. órában történt kvantitatív citofluorimetriás meghatározása (AnnexinV-/PI+) is megerősítette, mivel a kétdimenziós tenyészetekhez képest közel hússzoros volt arányuk a háromdimenziós tenyészetben (4. ábra).

A hosszú távú kezelések a kétdimenziós tenyészetek esetén nehezen kivitelezhetők, mivel a sejtek néhány nap után túlszaporodnak, elérik maximális konfluenciájukat. A RAFT™ esetben a sejtek több síkban helyezkednek el a kollagénmátrixban, így minden egyes sejt körül háromdimenziós tumorsejtcsoportok alakulnak ki. Ennek köszönhetően azonos kezdeti sejtszám mellett és azonos méretű tenyésztési térben később érik el a maximális sejtszámot, amely az A549 humán tüdőkarinómán mért adatok alapján körülbelül 48 órával később következett be.

A RAFT™ hátránya a kétdimenziós rendszerekhez képest az, hogy a nagy áteresztőképességű szűrések nehezen kivitelezhetők, és az anyagköltsége is jóval meghaladja

a kétdimenziós szűrések árát, tehát rövid távú (2-3 napos) hatóanyagszűrésekre nem feltétlenül alkalmazható. Kiválóan alkalmas viszont olyan aktív hatóanyagok további vizsgálatára és EC50/IC50 meghatározására, amelyek a hagyományos kétdimenziós hatóanyagszűréseken biztató eredményekkel szolgáltak, valamint olyan vizsgálatokra, amelyek időtartama a kétdimenziós tenyészetek exponenciális szakaszán néhány nappal túlnyúlik. A hatóanyagok különböző szövetekbe való diffúziója meghatározott fizikokémiai tulajdonságok alapján történik, mint például az anyag hidrofobicitása, molekulatömege, töltése, valamint a sejtek tápanyag-felvételi sebessége. Ilyen típusú vizsgálatokra viszont a hagyományos kétdimenziós szűrések nem igazán alkalmasak, mivel bennük az extracelluláris tér egyáltalán nem modellezett. A RAFT™ háromdimenziós modell erre megoldást jelenthet, mivel az *in vivo* tumor mikro környezetében található extracelluláris tér kollagénekoncentrációjához nagyban hasonlító kollagénmátrix található benne, így megfelelően képes lehet utánozni az *in vivo* tumorok mikro környezetét és az azon átdiffundálni képes hatóanyagok tényleges felszívódását.

Végezetül kijelenthetjük, hogy a háromdimenziós *in vitro* tumormodellek fejlesztése még korántsem tekinthető befejezettnek. A kisméretű műanyag lyukakba zsúfolni kívánt végtelenül komplex tumor-mikro környezet kellően pontos leképezése még többévtizedes közös munkát követel a tudományterület művelőitől és a velük párhuzamosan dolgozó fejlesztőktől egyaránt, hogy azok a több évtizede megbízhatóan működő kétdimenziós modelleken túl is mutassanak. A sikerhez vezető úthoz tartozik a kutatásunkban vizsgált háromdimenziós modellrendszer is, amely alkalmas arra, hogy a kevésbé életszerű *in vitro* kétdimenziós tesztekben aktívnak tűnő hatóanyagokat egy olyan komplex háromdimenziós *in vitro* tumorsejtmodellel tudjuk tovább jellemezni, melynek segítségével pontosabb hatóanyagprofil tudunk kapni egy adott tumorsejt típusról, amely már a preklinikai kísérletekben és a klinikai diagnosztikában és terápiában is pontosabban alkalmazható.

IRODALOM

- Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424:870–872, 2003
- Weigelt B, Lo AT, Park CC, et al. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* 122:35–43, 2010
- Jianmin Z, Hongfang W, Meifu F. Resistance of multicellular aggregates to pharvorubicin observed in human hepatocarcinoma cells. *Braz J Med Biol Res* 35:255–260, 2002
- Forde PM, Rudin CM. Crizotinib in the treatment on non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 13:1195–1201, 2012
- Zupkó I, Molnár J, Réthy B, et al. Anticancer and multidrug resistance-reversal effects of solanidine analogs synthesized from pregnadienolone acetate. *Molecules* 19:2061–76, 2014
- Puskás LG, Fehér LZ, Vizler C, et al. Polyunsaturated fatty acids synergize with lipid droplet binding thalidomide analogs to induce oxidative stress in cancer cells. *Lipids Health Dis* 9:56, 2010
- Ozsvári B, Puskás LG, Nagy LI, et al. A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds. *Int J Mol Med* 25:525–530, 2010
- Antal O, Hackler L Jr, Shen J, et al. Combination of unsaturated fatty acids and ionizing radiation on human glioma cells: cellular, biochemical and gene expression analysis. *Lipids Health Dis* 13:142, 2014
- Madácsi R, Kanizsai I, Fehér LZ, et al. Aromatic sulfonamides containing a condensed piperidine moiety as potential oxidative stress-inducing anticancer agents. *Med Chem* 9:911–919, 2013
- Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol* 83:849–871, 2007
- Friedrich J, Seidel C, Ebner R, et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 4:309–324, 2009
- Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, et al. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *Br J Cancer* 56:325–327, 1987
- Carlsson J, Acker H. Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *Int J Cancer* 42:715–720, 1988
- Amann A, Zwierzina M, Gamerith G, et al. Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour – stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 9:e92511, 2014
- Gunniss P, Mueller D, Shevchenko V, et al. 3D Organotypic cultures of human HepaRG cells: a tool for *in vitro* toxicity studies. *Toxicol Sci* 133:67–78, 2013
- Lupberger J, Mund A, Kock J, et al. Cultivation of HepG2.2.15 on Cytodex-3: higher yield of hepatitis B virus and less subviral particles compared to conventional culture methods. *J Hepatol* 45:547–552, 2006
- Ellinger B, Silber J, Prashar A. A phenotypic screening approach to identify anticancer compounds derived from marine fungi. *Assay Drug Dev Technol* 12:162–175, 2014
- Lin CY, Huang CH, Wu YK, et al. Maintenance of human adipose derived stem cell (hASC) differentiation capabilities using a 3D culture. *J Biotechnol Lett* 36:1529–1537, 2014
- Mrakovcic M, Absenger M, Riedl R, et al. Assessment of long-term effects of nanoparticles in a microcarrier cell culture system. *PLoS One* 8:e56791, 2013
- Magdeldin T, López-Dávila V, Villemant C, et al. The efficacy of cetuximab in a tissue-engineered three-dimensional *in vitro* model of colorectal cancer. *J Tissue Eng* 5:2041731414544183, 2014
- Levis HJ, Kureshi AK, Massie I, et al. Tissue engineering the cornea: the evolution of RAFT. *J Funct Biomater* 6:50–65, 2015