

3D szöveti szerkezet hatása a gyógyszerérzékenységre – 3D bionyomtatott „szövetmodellek” a daganatkutatásban

MOLDVAI DOROTTYA, SZTANKOVICS DÁNIEL, DANKÓ TITANILLA, SZALAI FATIME, MIYAURA RISA, PETŐVÁRI GÁBOR, KRENCZ ILDIKÓ, GELENCSÉR REBEKA, SEBESTYÉN ANNA

Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

A publikáció megjelenését a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (TKP2021-EGA-24, NKFI-FK-128404, NKFI-K-142799, Project No. ED_17-1-2017-0009), a Kulturális és Innovációs Minisztérium Új Nemzeti Kiválósági Ösztöndíja (ÚNKP-22-4-I-SE-12, ÚNKP-22-6-SE-3) és a Magyar Sztenológiai Társaság támogatta.

Levelezési cím:

Dr. Sebestyén Anna, Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26., e-mail: hsebanna@gmail.com, tel.: +36-30/977-5116

Közlésre érkezett:

2023. május 3.

Elfogadva:

2023. szeptember 5.

Az originális gyógyszerfejlesztés költséghatékonyságának problémái és az állatkísérletek etikai vonatkozásai új, hatékonyabb preszelektiót lehetővé tevő *in vitro* modellrendszerek kialakítását igénylik. Célunk különböző daganatsejtvonalakkal *in vitro* 3D bionyomtatott tumorszövetek létrehozása robusztus mechanizmus- és hatóanyag-vizsgálatokhoz. Többféle humán tumorsejtvonalból (emlőkarcinóma, vesekarcinóma, glióma stb.) hoztunk létre bionyomtatott szövetszerű struktúrákat, melyeket ZR75.1 sejtvonal esetén részletesebben jellemeztünk. A kialakuló szöveti heterogenitást, a struktúra növekedési ütemét és hatóanyag-érzékenységét más modellrendszerekkel hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján a bionyomtatott *in vitro* struktúrákban egy hét után kimutatható a szövetformálódás, és a tenyészetek akár hosszabb ideig is fenntarthatók. A kialakuló „szövetben” immunhisztokémiai festésekkel az *in vivo* tumorokéhoz hasonló szöveti heterogenitás igazolható. A bionyomtatott struktúrákat emellett az *in vivo* tapasztalható hatóanyag-érzékenység (rezisztencia megjelenése) jellemzi. Mindezek alapján a 3D bionyomtatott *in vitro* daganatmodellek az *in vivo* modellekhez sok tekintetben hasonló viselkedést mutatnak, így a korábbiaknál jobb *in vitro* modellként, kevesebb állatkísérlet felhasználásával tehetik hatékonyabbá onkológiai területeken is a gyógyszerfejlesztéseket. *Magy Onkol* 67:237–246, 2023

Kulcsszavak: daganatmodellezés, *in vitro* sejtkultúra, 3D bionyomtatás, gyógyszerfejlesztés, szöveti heterogenitás

The issues surrounding the cost effectiveness of drug development and the ethical concerns associated with animal testing, emphasise the necessity for innovative in vitro models that allow enhanced pre-selection. Therefore, we aim to create 3D bioprinted tissue mimetic structures (TMS) utilizing various human cancer cell lines. We have generated TMSs from human tumour cell lines (breast, kidney, glioma), with detailed characterisation of the ZR75.1 cell line. In this study, the tissue heterogeneity, the growth rate, and the drug sensitivity of different in vitro and in vivo models were compared. Tissue formation occurs within the TMS after one week, with a tissue heterogeneity similar to in vivo growing tumours. Moreover, TMSs exhibit similar drug sensitivity to that observed in vivo. In summary, the established 3D bioprinted TMSs represent an advanced in vitro model, which can contribute to achieve a more effective and ethical drug development process in the field of oncology.

*Moldvai D, Sztankovics D, Dankó T, Szalai F, Miyaura R, Petővári G, Krencz I, Gelencsér R, Sebestyén A. Effects of 3D tissue structure on drug sensitivity – 3D bioprinted tissue mimetic structures in cancer research. *Magy Onkol* 67:237–246, 2023*

Keywords: cancer, *in vitro* test, bioprinting, 3D cell culture, drug development

BEVEZETÉS

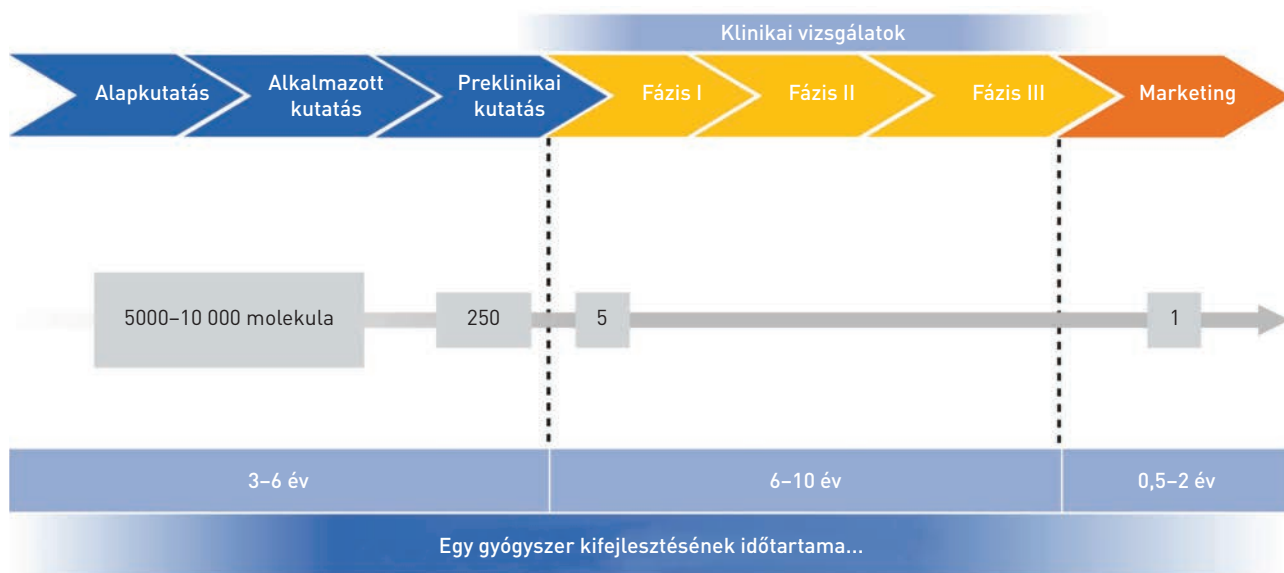
A gyógyszeripar kihívásai

A gyógyszeripari originális kutatások és fejlesztések költségei évről évre növekednek: egy gyógyszer fejlesztésének becsült átlagos költsége (a sikertelen fejlesztések költségeit is figyelembe véve) 2021-ben 1986 millió dollár, míg 2022-ben 2284 millió dollár volt. Nemcsak a fejlesztések költsége, de a klinikai vizsgálatok átlagos hossza is folyamatosan nő (onkológiai területen 2018-ban még csak 9,4 év, míg 2022-ben 11,6 év volt ez az idő) (1. ábra) (1). Az elmúlt évtizedben a klinikai gyógyszerfejlesztések hatékonysága (ún. klinikai fejlesztési termelékenység: klinikai vizsgálatok hossza a siker valószínűségéhez képest) más betegcsoportokhoz viszonyítva az onkológia területén volt a legalacsonyabb (2). Jól ismert az is, hogy a rosszindulatú daganatok a vezető halálokok közé tartoznak, és a legnagyobb igyekezet és a kutatás-fejlesztésre költött dollármilliók ellenére sem csökken a daganatos halálozás (3). Sürgős szükség van tehát a gyógyszerfejlesztés költségeinek mérséklésére, a folyamat egyszerűsítésére és a hatékonyság javítására, amiben segítséget nyújthatnak a jobb preklinikai prediktív értékeket mutató modellrendszerek is.

A hatóanyagok tesztelésében felhasználható modellrendszerek fejlesztését sürgeti az is, hogy 2023 áprilisától az Európai Unió (EU) az újonnan forgalomba hozott kozmetikai

termékek állatokon való tesztelése mellett tiltja az olyan kozmetikai termékek forgalomba hozatalát is, amelyek akár csak egyetlen állaton tesztelt új összetevőt tartalmaznak, még akkor is, ha a végterméket állatkísérletekben nem vizsgálták, vagy a tesztet Európán és az Egyesült Államokon kívül végezték el (4). Hasonló konkrét szabályozás a gyógyszerhatóanyagokkal kapcsolatban még nem született, de mind az európai (European Medicines Agency – EMA), mind az amerikai (U.S. Food and Drug Administration – FDA) gyógyszerügyi hatóság modernizációs céljai között szerepel az állatkísérletek számának csökkentése és azok mielőbbi *in vitro* alternatíváinak kidolgozása. A legutóbbi járványhelyzetben a koronavírus elleni vakcinák fejlesztése, majd ezek rendkívül gyors bevezetése is megmutatta, hogy a gyógyszeriparban szükség van a jelenlegieknél gyorsabb és hatékonyabb módszerek, tesztek kialakítására (5). Ez krízishelyzetekben segítené a szükséges gyógyszerek fejlesztési idejének és költségeinek csökkentését is. Ehhez olyan új betegségmodellekre van szükség, amelyek nagyobb hatékonysággal segítenek kiválasztani a fejlesztésekbe belépő vezérmolekulákat, és jobban mutatják a klinikai fázisvizsgálatok várható hatékonyságát is.

„Minden modell hibás, de néhány hasznos” – ezt az idézetet George E. P. Box brit statisztikusnak tulajdonítják. Szinte lehetetlen olyan modell létrehozása, amely tökéletesen leképezi a valóságban zajló folyamatokat, ennek



- Egy gyógyszer fejlesztése a kezdetektől az engedélyeztetésig általában 10–15 évet vesz igénybe.
- 5000–10 000 molekulából mindössze egy jut el az engedélyeztetésig és a forgalomba hozatalig.
- Azoknak a hatóanyagoknak, amelyek elérik a klinikai fázisvizsgálatokat, mindössze 16% esélyük van arra, hogy forgalomba kerüljenek.
- Egyetlen gyógyszer forgalomba hozatalának átlagos k+f-költsége nagyjából 2000 millió dollár, a sikertelen fejlesztéseket is beleszámolva.

1. ÁBRA. A preklinikai és klinikai gyógyszerfejlesztés fázisainak átlagos időtartama nagyjából 10–15 év, és a belépő molekulák közül (5000–10 000 db) mindössze egyetlen hatóanyag kapja meg a forgalombahozatali engedélyt. A klinikai fázisvizsgálatokba belépve átlagosan mindössze 16% esélye van egy-egy molekulának a forgalombahozatali engedély megszerzésére (ez az arány az onkológiai területre szűkítve még alacsonyabb)

ellenére törekedni kell arra, hogy a lehetőségekhez mérten a lehető legjobban, a legkisebb hibával közelítsük a valós folyamatokat.

A jelenlegi preklinikai vizsgálati modellrendszerek előnyei és hátrányai

A gyógyszerfejlesztés kezdeti fázisában a lehetséges molekulák száma rengeteg – az *in silico* modellezés a molekula hatásának szoftveres szimulálásával lehetőséget ad a további vizsgálatokra bocsátott vezérmolekulák kiválasztására. A rendelkezésünkre álló adatmennyiség folyamatos növekedése mellett az egyre bővülő és javuló bioinformatikai eszköztár lehetővé teszi az *in silico* módszerek tökéletesítését és az ezen a módszeren alapuló preszelekció találati arányának növelését. Ezek a módszerek ma már komplex biológiai jelenségek felderítésében és előrejelzésében is segítenek. A magyar vonatkozású Turbine AI startup cég például mesterséges intelligencia segítségével szimulálja a tumorsejtek viselkedését, és ígéretes gyógyszer-célpontokat azonosítva támogatja a gyógyszerfejlesztés lépéseit. Az *in silico* módszerek vitathatatlan előnye, hogy sokkal gyorsabbak és olcsóbbak a klasszikus tesztekénél, eredményeik azonban mindig szigorú kísérleti igazolást és validálást igényelnek, így egyedüli modellrendszerként nem elegendők a gyógyszerfejlesztésben.

A tradicionális preklinikai kutatások *in vitro* fázisaiban a tumorsejteket kétdimenziós (2D) közegben (Petri-csészében, ill. tenyésztőfűlkében) tenyésztik. Ezek a vizsgálatok az orvostudomány és a daganatkutatás számos mérföldkövének eléréséhez járultak és járulnak hozzá mind a mai napig. Az utóbbi évtizedben végzett vizsgálatok eredményei azonban alátámasztják, hogy ugyanazon típusú daganatsejtek 2D sejttenyészetekben, állatmodellekben és végső soron a páciensekben eltérően viselkedhetnek (6). Ez részben azon alapul, hogy az emberi szervezetben megjelenő komplex tumor-mikrokörnyezeti interakciók a 2D sejt-kultúrákban nehezen vagy egyáltalán nem modellezhetők (7). A 2D sejt-kultúrákból hiányoznak az érhálózatok, a különféle stróma- és immunsejtek, illetve ezek hatásai, amelyek jelentősen befolyásolják a tumorszövetben a sejtek viselkedését (8). Az előbbiek jelentősen módosíthatják a tumor és összességében a beteg terápiás válaszát és a megjelenő mellékhatásokat is (9).

Az onkológiai kutatásokban használt *in vivo* modellként az előbbi hiányosságok kiküszöbölésére jelentek meg az ún. xenograftmodellek (immundeficiens egerekbe ültetett humán tumorsejtek, szövetek). Ebben a modellrendszerben azonban erősen limitáló tényező, hogy a tumor-mikrokörnyezet nem humán (10). A xenograftkísérletek az előbbiek mellett rendkívül időigényesek, drágák, és élő állatok használatát teszik szükségessé, illetve bizonyos terápiák fejlesztésében egyáltalán nem alkalmazhatók (pl. immunterápia – bár léteznek humanizált immunrendszerű egerek). Az is ismert, hogy több sikeres állatkísérletet követően is számos gyógy-

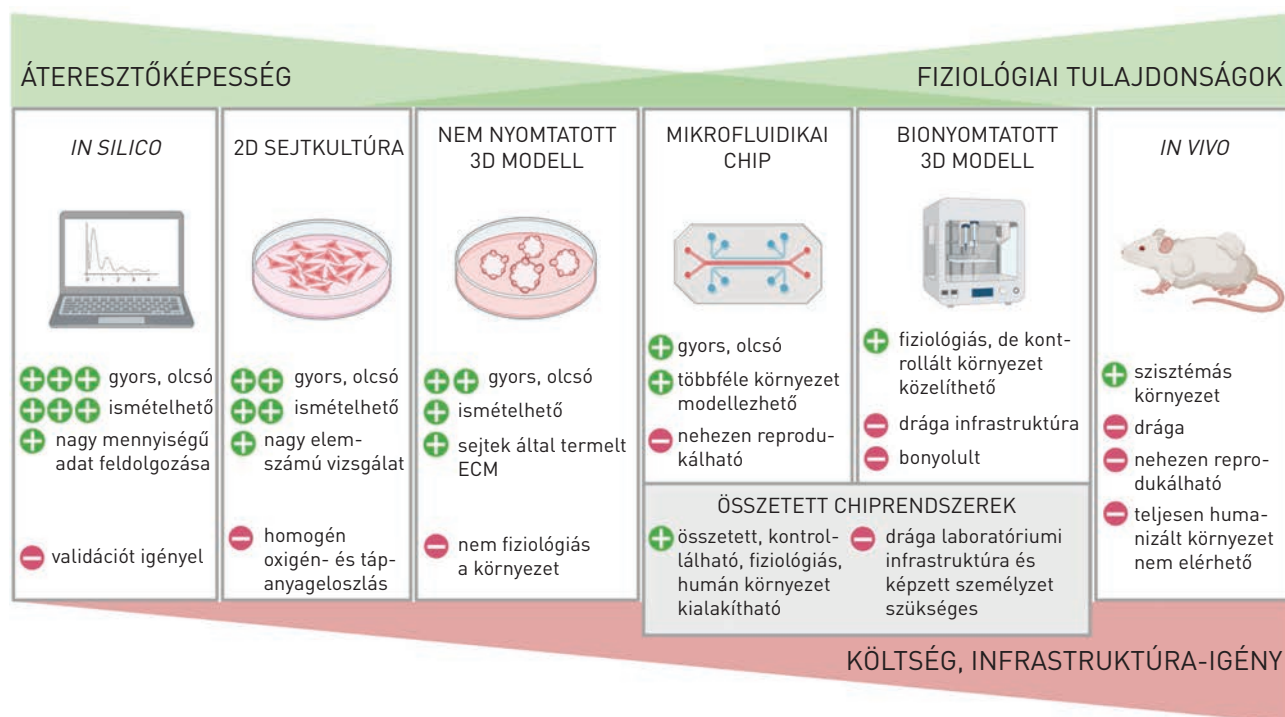
szerjelölt molekula bukik meg a későbbi fázisvizsgálatokban (az I. fázisból az engedélyezésig eljutó hatóanyagok aránya átlagosan 16% – onkológiai területen ez az arány a legalacsonyabb: 8,3%, szemészeti készítmények esetén pedig a legmagasabb: 29,5%) (11, 12).

Szükség van tehát olyan további humán sejtalapú preklinikai modellekre, amelyek az előbbieknél jobban közelítik az emberi daganatok szerkezetét és azok mikrokörnyezetét is. Az elmúlt 15 évben a régebben alkalmazott háromdimenziós (3D) tenyészetek újraélesztése mellett számos új 3D sejttenyésztési technika fejlesztése indult el (13). Ilyen technikák az organoidok, a függőcsepp- (hanging drop) kultúrák, szferoidkultúrák (pl. low attachment tenyésztőedények alkalmazása), a mátrigélbe ágyazott sejtek tenyésztése vagy az újabb mágneses levitációs technika, illetve a mindössze néhány éve megjelent 3D bionyomtatás. A 3D bionyomtatással kialakítható *in vitro* tenyészetekben nemcsak a sejtek alapvető 3D növekedésének feltételei teremthetők meg, hanem pontosan tervezhető a struktúrára, a tumor- és nem tumoros sejtek összetétele, aránya és térbeli elrendeződése is. Az élősejtes bionyomtatást alkalmazva pontosabb, az eredeti tumorszöveteket jobban közelítő szöveti szerkezet és strukturális összetettség alakítható ki.

A mikrofluidikával (és bizonyos esetekben 3D bionyomtatással) kombinált összetett daganatmikrochip-rendszerek megjelenésével még tovább növelhető az *in vitro* kultúra összetettsége (organ-on-chip, body-on-chip technikák) (14). Ezekben a rendszerekben a tumorsejteket perfundálható csatornáknak nevelik, melyek üvegbe, szilikonba vagy polimer membránba vannak formázva, gravírozva. Ez az elrendezés lehetőséget nyújt különböző sejtípusok közötti kölcsönhatások (pl. endotél – tumorsejt) tanulmányozására, a szervezetben és tumorszövetben belül található gradiensek és folyadékáramlás modellezésére; így közelebb kerülve pl. a fiziológiailag releváns metasztázismodellezéshez (15) (2. ábra).

In vitro 3D modellek fejlesztése – 3D bionyomtatás

Jól ismert, hogy az *in vitro* 3D modellekben a tumorsejtek másképp viselkednek, mint a hagyományos 2D sejttenyészetekben: eltérő növekedési kinetikát, morfológiát, terápiás válaszokat, megváltozott jelátviteliútvonal-aktivitást és fehérjeexpressziós mintázatot mutatnak (16, 17). Ezeket a tulajdonságokat nem csupán a sejtek 3D növekedési struktúrája módosíthatja, hanem a speciális mikrokörnyezet is (a sejtek által termelt saját extracelluláris mátrix, az erek által biztosított oxigén- és tápanyaggradiens jelenléte és a különböző nem tumor sejtek jelenléte). A 3D bionyomtatás lehetőséget nyújt bonyolultabb, összetett sejtes rendszerek megtervezésére és létrehozására (16): segítségével többféle típusú sejt, illetve különböző extracelluláris környezet hozható létre a biotinták (hidrogélben elkevert sejtek, mely a nyomtató tintájaként alkalmazható) segítségével. A bio-



2. ÁBRA. A preklinikai vizsgálatok során alkalmazható *in silico*, *in vitro* (2D sejtkultúra, nem nyomtatott 3D modell, mikrofluidikai chip, bionyomtatott 3D modell és összetett chiprendszerek) és *in vivo* modellrendszerek előnyei és hátrányai

tinták kialakításához sokféle, speciális összetételű hidrogél áll rendelkezésünkre (1. táblázat) (18). A nyomtatást követően a nyomtatott szövetszerű struktúrák a tumorok *in vivo* környezetét és a tumor szöveti heterogenitását is modellezik, ezzel összefüggésben *in vitro* körülmények között jobban prediktálhatják az *in vivo* kezelésre várható válaszokat (19, 20).

A 3D bionyomtatott tumormodellek tervezése bonyolult interdiszciplináris folyamat, melynek első lépése a megfelelő nyomtatási technika kiválasztása: extrúziós, inkjet (tinta-sugaras), lézeraszisztált és sztereolitográf technológiák közül választhatunk. A következő lépés a nyomtatási fájlok megtervezése és megalkotása: számítógépes 3D tervezőprogramok (CAD-szoftverek) és kreativitás segítségével látványos és bonyolult szerkezeteket is létrehozhatunk. Akár többféle sejtet és közeget tartalmazó, szövetszerű struktúrákat is (pl. szívserű, dobogó *in vitro* modellek) tervezhetünk. Ezeket a létrehozott tömör modelleket a 3D nyomtatók esetében általánosan használt „dróthálós” kód formátumba kell alakítani (legelterjedtebb fájlformátumok: STL, AMF, 3MF, OBJ). A 3D nyomtatók legtöbbször G-code-hoz hasonló gépi kód/utasítások alapján tartalmazzák a 3D nyomtató számára szükséges utasításokat, mint például azt, hogy milyen irányba mozogjon a nyomtatófej az egyes rétegek között, illetve milyen nyomással és sebességgel történjen a nyomtatás.

Ezzel párhuzamosan a megfelelő biotinták és nyomtatási körülmények kiválasztásának is meg kell történnie, ez az élő sejtekhez használható biotintáknak ugyanis több kritériumnak kell megfelelniük: biokompatibilisnek kell lenniük, oxigén- és tápanyag-permeabilitással kell rendelkezniük, gélképződési reakciójuk nem lehet toxikus, viszkoelasztikus, biodegradációs tulajdonságaik mellett kontrollálható rigiditással kell rendelkezniük és a szükséges nyomtatási körülmények (nyomás, hőmérséklet, biotinta-kereszt kötési módszer – pH, UV, hő vagy egyéb kémiai hatások, túátmérő stb.) nem károsíthatják az élő sejteket. Előbbiek mellett a nyomtatott sejtek *in vitro* tenyésztését követően a szöveti formálódáshoz szükséges időt, illetve az adott kísérletekhez szükséges kezelési időket kell meghatározni. Fontos előkészítést igénylő további feladat a kapott szövetekből nyerhető proliferációs, viabilitási, egyéb molekuláris biológiai vagy patomorfológiai adatok meghatározásához szükséges módszerek, a minta-előkészítési eljárások vagy adott eszköz optimalizálása is.

Az alábbiakban saját eredményeinket mutatjuk be, amelyekben a legkülönbözőbb humán tumorsejtvonalak segítségével alakítottunk ki 3D bionyomtatott *in vitro* szövetszerű struktúrákat, ezekben igazoltuk a szövetformálódást is. Vizsgáltuk a bionyomtatott struktúrák növe-

1. TÁBLÁZAT. A 3D bionyomtatáshoz használt hidrogélek típusai, ezek előnyei, hátrányai és a lehetséges keresztkötetési mechanizmusai

Típus	Alap	Előnyök	Hátrányok	Keresztkötetés
Természetes	alginát	alacsony költség könnyű kezelhetőség magas viabilitás gyors géllépcsés	immunogén nem biomimetikus alacsony sejtdhézió gátolja a migrációt	ionos
	zselatin	biokompatibilis alacsony költség jó sejtdhézió vízoldékony reverzibilis géllépcsés	hőmérsékletfüggő viszkozitás termoregulációt igényel alacsony mechanikai stabilitás kémiai módosítást igényel	kémiai hőmérséklet enzimatis
	mátrigél	gyakran használt régóta ismert biokompatibilis jól karakterizált	komplex reológiai viselkedés alacsony mechanikai stabilitás drága	hőmérséklet
	kollagén-I	biokompatibilis magas sejtdhézió nem immunogén enzimatisan lebontható jó mechanikai tulajdonságok	alacsony formatartás nehezen kezelhető	pH hőmérséklet
	hialuronsav	biokompatibilis kémiai módosulatok elérhetőek gyors géllépcsés	alacsony mechanikai stabilitás	fizikai vagy kovalens
	agaróz	biokompatibilis magas strukturális stabilitás	nehezen kezelhető magas hőmérséklet	hőmérséklet ionos
	fibrin	koncentrációfüggő mechanikai stabilitás biokompatibilis enzimatisan lebontható gyors géllépcsés	drága termoregulációt igényel	enzimatis
	polipeptidek	nem igényel keresztkötést		
	decellularizált mátrix	biomimetikus választható szövetspecifitás magas viabilitás	alacsony stabilitás hosszú nyomtatási folyamat	változó
	Szintetikus	akrilamid	módosítható elasztikuság gyors géllépcsés	
pluronic		változó mechanikai stabilitás	alacsony sejtproliferáció alacsony sejtdhézió	
polietilén-glikol (PEG)		könnyen módosítható kémiailag hidrofil jó mechanikai tulajdonságok gyors géllépcsés	alacsony sejtproliferáció alacsony sejtdhézió	UV

kedését és kezelőszerekkel szemben mutatott érzékenységet. A kapott eredményeket összevetettük ugyanazon sejtvonalak esetében más modellrendszerekben kapott érzékenységi adatokkal és az *in vivo* xenograftok esetében tapasztaltakkal.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Irodalomkutatás

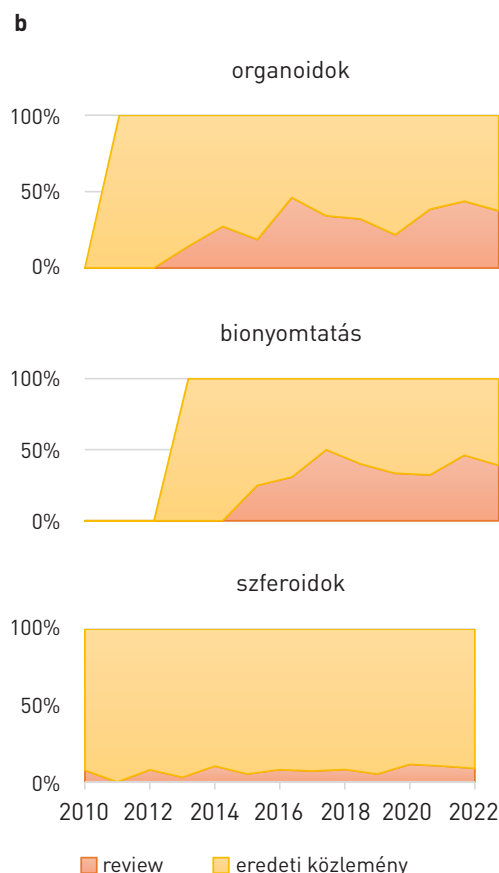
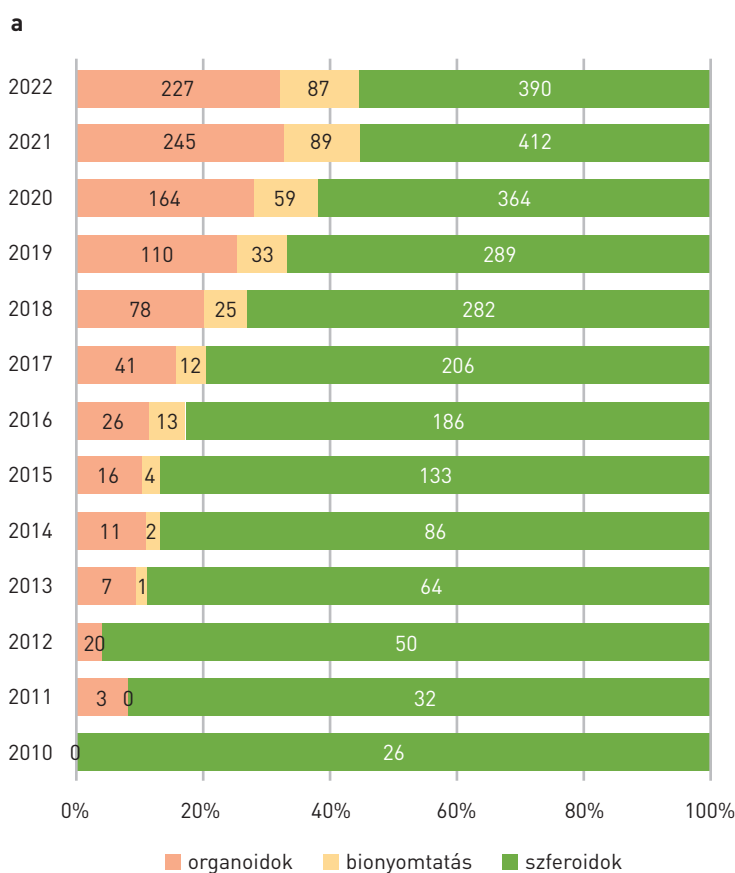
A daganatbiológiai kutatásokban alkalmazott tumormodellekkel kapcsolatos irodalmi adatokat a PubMed adatbázisban vizsgáltuk a következő keresőszavakkal: „cancer model” AND „3D” AND „organoid” vagy „bioprinting” vagy „spheroid”. A találatok eloszlását 100%-ig halmozott oszlopdiagramon jelenítettük meg, hogy a találatok százalékos eloszlása és a publikációk számának növekedése is követhető legyen. A három típusú 3D tumormodell (szferoid, organoid, bionyomatott modell) találatai között az összefoglaló és eredeti közlemények arányát is vizsgáltuk.

Vizsgált sejtvonalak, 3D bionyomatás

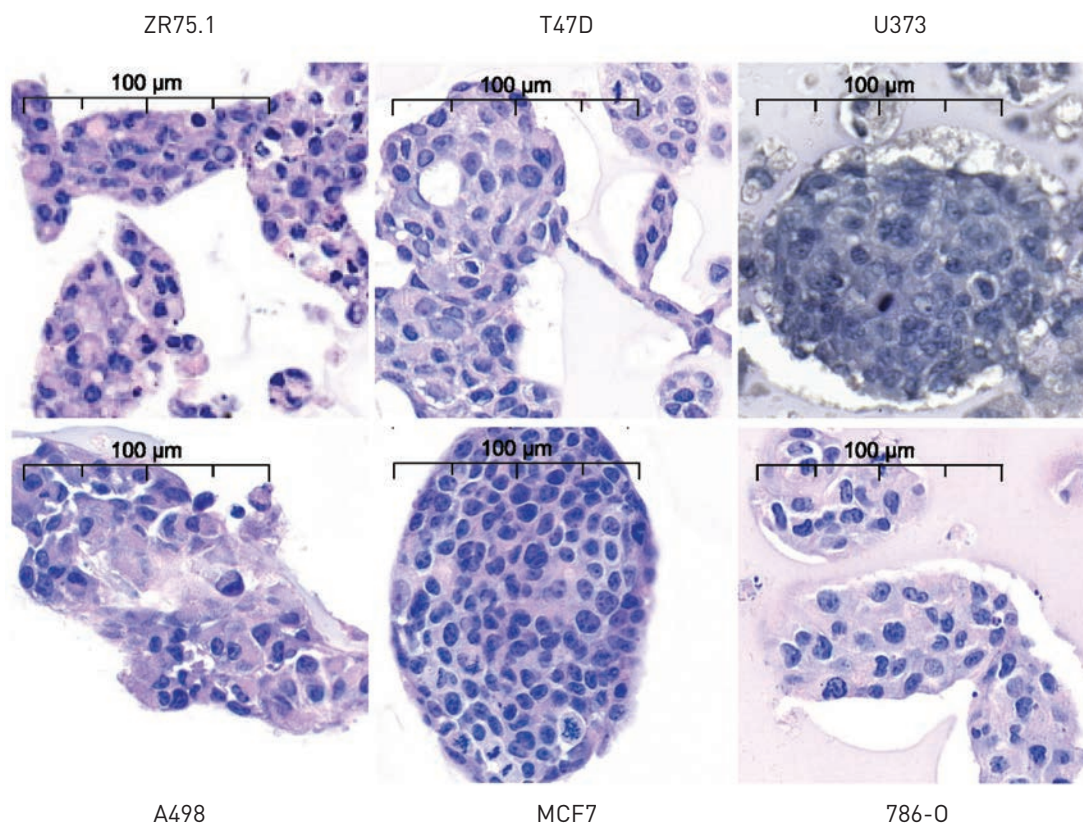
Munkánk során több humán sejtvonallal (T47D, MCF-7 – luminális A emlőkarcinóma; ZR75.1 – luminális B emlőkarcinóma; U373 – asztrocitóma; A498, 786-O – világossejtes vesedaganat) állítottuk be a 3D bionyomatás folyamatát. A nyomtatáshoz extrúziós típusú bionyomatót (Gesim Bio-Scaffolder 3.2) használtunk. A bemutatott eredményekben biotintaként kétféle gélt használtunk, alginát-zselatin alacsony szilárdságú sejt gélt, illetve alginát-metilcellulóz tartalmú, magas rigiditású vázgeét (mely a nyomtatott struktúrák alakját határozza meg kalcium-kloridos keresztkötést követően).

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat ZR75.1 sejtvonalból indított 2D sejtkultúrákon (citospin-centrifugálást követően), 3D bionyomatott struktúrákon, illetve xenograft tumorokon (1 hetes *in vitro* előtenyésztett nyomtatott struktúra, ill. 21 napig *in vivo* növekvő tumorból készült paraffinos blokk) végeztük.



3. ÁBRA. A modellrendszerek fejlődésének áttekintése a PubMed adatbázisban 2010–2022 között publikált tudományos közlemények alapján. a) A daganatbiológiai kutatásokra 3D modellrendszereket (organoid, szferoid, bionyomatás) alkalmazó közlemények százalékos megoszlása és darabszáma. A közlemények darabszáma folyamatos növekedést mutat, az *in vitro* 3D modellek közül pedig egyre népszerűbbek az organoid, ill. 3D bionyomatott modellek. b) A 3D modellrendszereket alkalmazó összefoglaló és eredeti közlemények százalékos aránya. Míg a szferoidok esetén az elmúlt tíz évben az összefoglaló és eredeti közlemények aránya (1:9) nem változott, az organoidok és bionyomatott modellek esetén a review típusú közlemények száma évek óta közel 40%-ot tesz ki



4. ÁBRA. Különböző emberi eredetű tumorsejtvonalból 3D bionyomatott szövetszerű struktúrák (T47D, MCF-7 – lúminális A emlőkarcinóma; ZR75.1 – lúminális B emlőkarcinóma; U373 – asztrocitóma; A498, 786-O – világossejtes vesedaganat) egy hét előtenyésztés után. A mintákból formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokk metszetén készült hematoxin-eozin festés látható

A festést általános immunhisztokémiai protokoll alapján, FASN p-ACC, pmTOR, pS6 (Cell Signaling) és GLS (Abcam) primer ellenanyagokkal, DAB kromogénnel és hematoxin háttérfestéssel végeztük [21].

Proliferációs vizsgálatok

ZR75.1 *in vitro* és *in vivo* modellrendszerekben a gátlószerekkel (rapamicin, doxorubicin) szembeni érzékenységet többféle proliferációs esszével (*in vitro*: Alamar Blue, Sulforhodamine B; *in vivo*: tumorméret követése) vizsgáltuk. Az eredményeket minden esetben a kontrollhoz (100%) viszonyítva adtuk meg.

Az állatkísérletek elvégzéséhez szükséges etikai engedély száma: SE KREB 216/2020.

EREDMÉNYEK

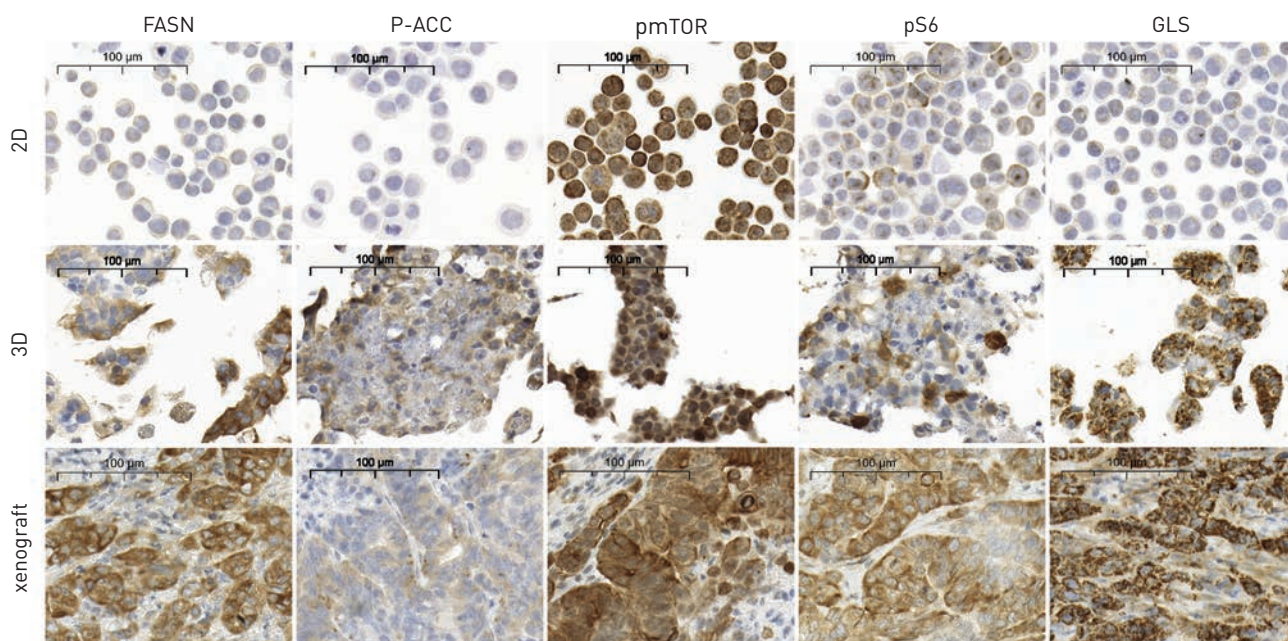
Az *in vitro* 3D modellrendszerek fejlődése

3D sejtenyésztési módszerként korábban a szferoidok használata volt jellemző. Az utóbbi tíz évben azonban az organoidok és a 3D bionyomatás egyre népszerűbbé váltak, használatuk folyamatosan növekszik, egyre nagyobb

teret hódítanak. Érdekes azonban, hogy míg a szferoidok esetén az évente megjelenő közlemények mindössze 10%-a review, addig a 3D bionyomatással és organoidokkal foglalkozó közlemények között meglepően magas, közel 40% összefoglaló közleményt találunk a megjelenésüket követő évek óta [3. ábra].

3D bionyomatott tumormodellek létrehozása

Munkánkban az elmúlt két évben számos humán tumorsejtvonalból, primer sejtekből és izolált normális sejtekből is hoztunk létre 3D bionyomatott szövetszerű struktúrát. Különböző koncentrációjú alginát-, zselatin- és metilcellulóz-alapú, illetve különböző cégek által forgalmazott speciális összetételű (aminosav-alapú, teljesen szintetikus vagy ECM-szerű összetételű) és viselkedésű (UV-fényre, hőmérsékletre keresztlinktethető) hidrogél viselkedését és biokompatibilitását vizsgáltuk. A legagresszívabb daganatsejtek, mint az emlő-, vese- és egyes tüdődaganatok, illetve gliómák esetében saját alginátalapú biotintával hoztunk létre 3D bionyomatott *in vitro* tenyészeteket, amelyekben a szövetformálódást egy hét elteltével igazoltuk [4. ábra].



5. ÁBRA. A különböző modellrendszerek [ZR75.1 sejtvonal citospin, 3D bionymtatott struktúrák egy hét előtenyésztést követően és háromhetes xenografftumor-minták] szöveti heterogenitásának összehasonlítása immunhisztokémiai festést követően [FASN: zsírsav-szintáz; P-ACC: foszfo-acetil-CoA-karboxiláz – lipidanyagcserével, GLS-glutamináz – glutamin-anyagcserével és pmTOR, pS6 – mTOR-aktivitással összefüggő enzimek, fehérjék], hematoxilinn háttérfestéssel

***In vitro* tumormodellek szöveti heterogenitásának vizsgálata**

A szövetekben megjelenő metabolikus heterogenitás jelentősen hozzájárul a tumorok alkalmazkodóképességének fokozódásához, így a szekunder terápiareszisztencia megjelenéséhez. Az emberi tumorszövetek jellemző szöveti heterogenitását az *in vitro* 2D sejttenyészetek kevésbé tudják megjeleníteni – jellemzően homogén festődést mutatnak a legkülönbözőbb markerekkel. A 3D bionymtatott struktúrák esetében ugyanazon festések *in situ* tumorokhoz hasonló szöveti heterogenitása figyelhető meg számos metabolikus enzim esetén (5. ábra).

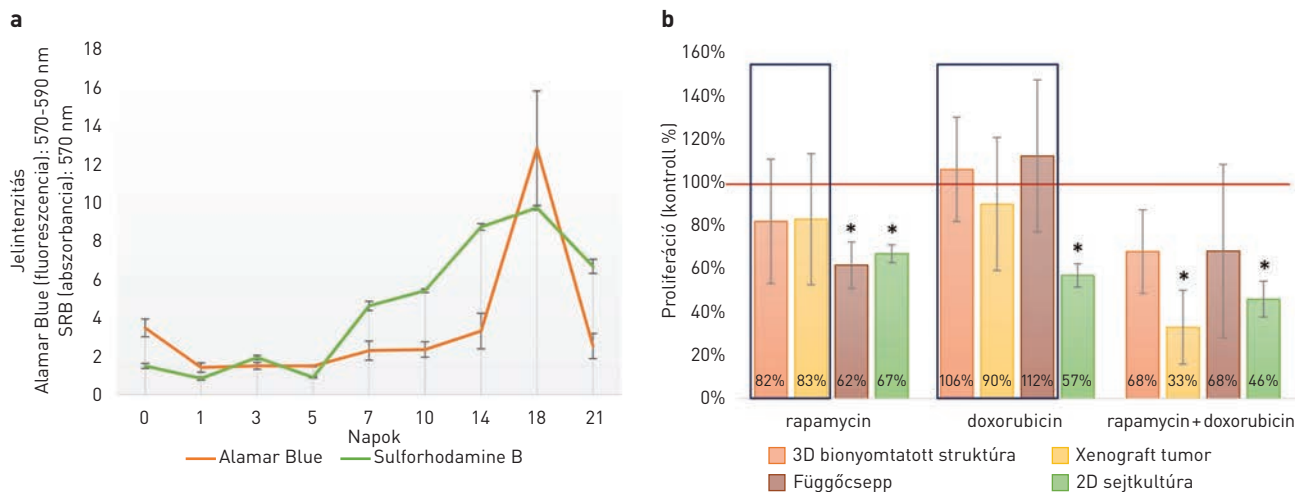
3D bionymtatott tumormodellek növekedése és hatóanyag-érzékenységének vizsgálata

A 3D bionymtatott tumorok tanulmányozása érdekében több hagyományos növekedési esszé adaptáltunk a modellrendszerre: a tenyésztésben a sejtek mennyiségi növekedésével arányos fehérjék mennyiségi növekedése [Sulforhodamine B esszé] és a sejtek metabolikus aktivitása [Alamar Blue esszé] is jól követhető. A bionymtatott ZR75.1 tumorsejtekből kialakított szöveti struktúra legalább 21 napig fenntartható, melynek során a 18. napig folyamatos növekedést mutat mind a fehérjemennyiség, mind a metabolikus aktivitás. Legújabb vizsgálatainkban igazoltuk, hogy a 2D, hagyományos 3D (függőcseppkultú-

rák) és bionymtatott 3D kultúrák terápiás szerekekkel és egyéb metabolikus gátlószerekkel szembeni érzékenysége eltérő. A nyomtatott *in vitro* szövetszerű modellek terápiás érzékenysége az *in vivo* növekvő xenograftokhoz hasonlóan jelentősen csökken. Eredményeik szerint a 3D bionymtatott struktúrák akár 3-4 hétig is tenyészthetők a szövet folyamatosan növekvő mennyisége mellett, ami alapján ezek a tenyészetek hosszú távú kezelések hatásának vagy a terápiareszisztencia kialakulási folyamatának vizsgálatát is lehetővé teszik (6. ábra).

MEGBESZÉLÉS

Bemutatott eredményeink alapján a legkülönbözőbb daganatsejtekből hozható létre 3D bionymtatott, szövetszerű struktúra, melyben a szövetformálódás általában már egy hét *in vitro* tenyésztés után megfigyelhető. Megfelelő körülmények között a struktúrák passzálás nélkül három hétig, illetve – a sejtek típusától, kísérleti céloktól függően – akár tovább is fenntarthatók. A hosszabb tenyésztési időtartam lehetővé teszi egyéb *in vitro* technikákkal ellentétben az *in situ* tumorokra jellemző szöveti heterogenitás kialakulását, illetve a hosszú távú kezelés lehetőségét is. Ez azért fontos, mert régóta ismert, hogy a szöveti heterogenitás hozzájárul a tumorok alkalmazkodóképességének fokozásán keresztül a terápiareszisztencia kialakulásához [21, 22], melynek *in vitro* vizsgálatára eddig nem vagy csak kompromisszumokkal és



6. ÁBRA. 3D bionymtatott ZR75.1 emlőráksejt vonal növekedésének és gyógyszerérzékenységének vizsgálata. a) ZR75.1 3D bionymtatott szövetszerű struktúrák növekedésének követése 21 napig, Alamar Blue (narancs) és Sulforhodamine B (zöld) proliferációs tesztekkel. b) ZR75.1 sejtek kezelőszerekkel (rapamycin: 50 ng/ml; doxorubicin: 50 ng/ml) szembeni érzékenységének vizsgálata különböző fenntartási módok (3D bionymtatott struktúra, xenograft tumor, függőcsepp- és 2D sejt kultúra) esetén. A 3D bionymtatott struktúra a monoterápiás kezeléseknél a xenograft tumorhoz hasonló, míg a 2D sejt kultúrától szignifikánsan eltérő reakciót mutatott

a folyamat modellezésének jelentős egyszerűsítésével volt lehetőség.

A monokultúra típusú 3D modellek tovább fejleszthetők többféle, akár tumorasszociált egyéb normális sejtekből (fibroblasztok, endotél stb.) készíthető biotintákkal, érszerű hálózatok integrálásával és egyéb komplex szöveti modell létrehozásával is. Ezek a törekvések jelenleg gyorsan fejlődő kutatások a 3D bionymtatás területén, egyre több komplex szerv- és betegségmodell fejlesztése zajlik, és az eredmények közlésére is sor kerül [23, 24].

A jövőben mindezek a törekvések a tumorbiológia területén elősegítik a tumorevolúció, a daganatsejtek térbeli és időbeli változásainak *in vitro* vizsgálatát is. Számos korábbi vizsgálat és közlemény hangsúlyozza például, hogy a tápanyag- és oxigénellátottság heterogén eloszlása jelentősen megváltoztatja a szöveteken belül a metabolikus folyamatok átrendeződését [25]. Ezzel összefüggésben a vizsgált modelljeink közül az *in vivo* és a 3D bionymtatott modellben mi is kimutattuk a lipidanyagcsere (FASN, p-ACC), az mTOR-aktivitás (p-mTOR, pS6) és a glutaminhasznosítás (GLS) egyes enzimeinek *in situ* expressziós mintázatában a heterogenitást, míg ez sem a sferoidokban, sem a 2D sejt kultúrákban nem jelenik meg eredményeink szerint.

IRODALOM

- Deloitte Centre for Health Solutions. Seize the digital momentum. Measuring the return from pharmaceutical innovation 2022. <https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/uk/Documents/life-sciences-health-care/deloitte-uk-seize-digital-momentum-rd-roi-2022.pdf>

A 3D bionymtatott daganatmodellek az *in vivo* tapasztalhatóhoz sok tekintetben hasonló viselkedést (növekedési ütem, hatóanyag-érzékenység) mutatnak, emiatt a korábbiaknál jobb *in vitro* modellként, ráadásul kevesebb állat használatával – vagy később akár állatok felhasználása nélkül – tehetik hatékonyabbá a gyógyszerfejlesztést. A 3D bionymtatott szöveti struktúrák alkalmazása javíthatja a vegyületek előszelektálásának sikerességét, a vezérmolekula kiválasztását és validálását, és ezzel növelheti a klinikai fázisú vizsgálatok sikerességi arányát is [26].

Köszönetnyilvánítás

Munkacsoportunk köszönettel tartozik a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének, vezetőjének, Dr. Matolcsy Andrásnak és minden kollégának, akik lehetővé tették a kutatásunk személyi és tárgyi feltételeit. Köszönjük Kurucz Csillának a szövettani metszetek elkészítését, Sztodola Andrásnak pedig az állatkísérletekben nyújtott segítségét. Köszönjük a labor TDK-hallgatóinak, Föhrécz Nórának és Csikós Bálintnak a labormunkák során nyújtott sok segítséget, mely nélkül a bemutatott eredmények nem jöhettek volna létre. Köszönettel tartozunk továbbá a Nemzeti Bionika Programnak, hogy lehetővé tette laborunk számára a 3D bionymtató beszerzését és ezzel a kutatás megvalósulását.

- IQVIA Institute. Global Oncology Trends 2022. <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/global-oncology-trends-2022>
- Roser M, Ritchie H. Cancer. <https://ourworldindata.org/cancer>
- European Parliament. E. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products (recast) (Text with EEA relevance). 2009

5. Ritskes-Hoitinga M. Medical regulators: look beyond animal tests. *Nature* 604:599, 2022
6. Ben-David U, Ha G, Tseng YY, et al. Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet* 49:1567–1575, 2017
7. Rodrigues J, Heinrich MA, Teixeira LM, et al. 3D *in vitro* model (r)evolution: unveiling tumor-stroma interactions. *Trends Cancer* 7:249–264, 2021
8. Law AMK, Rodriguez de la Fuente L, Grundy TJ, et al. Advancements in 3D cell culture systems for personalizing anti-cancer therapies. *Front Oncol* 11:782766, 2021
9. Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* 32:760–772, 2014
10. Yoshida GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol* 13:4, 2020
11. Wong CH, Siah KW, Lo AW. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics* 20:273–286, 2019
12. Deloitte M. Early Value Assessment 2020. https://www2.deloitte.com/content/dam/Deloitte/be/Documents/life-sciences-health-care/Deloitte%20Belgium_Early%20Value%20Assessment.pdf
13. Pozzi S, Scomparin A, Israeli Dangoor S, et al. Meet me halfway: Are *in vitro* 3D cancer models on the way to replace *in vivo* models for nanomedicine development? *Adv Drug Deliv Rev* 175:113760, 2021
14. Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer* 19:65–81, 2019
15. Tang Y, Soroush F, Sheffield JB, et al. A biomimetic microfluidic tumor microenvironment platform mimicking the EPR effect for rapid screening of drug delivery systems. *Sci Rep* 7:9359, 2017
16. Neufeld L, Yeini E, Reisman N, et al. Microengineered perfusable 3D-bioprinted glioblastoma model for *in vivo* mimicry of tumor microenvironment. *Sci Adv* 7:eabi9119, 2021
17. Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet* 19:671–687, 2018
18. Yi HG, Jeong YH, Kim Y, et al. A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. *Nat Biomed Eng* 3:509–519, 2019
19. Rijal G, Li W. A versatile 3D tissue matrix scaffold system for tumor modeling and drug screening. *Sci Adv* 3:e1700764, 2017
20. Utama RH, Tan VTG, Tjandra KC, et al. A covalently crosslinked ink for multimaterials drop-on-demand 3D bioprinting of 3D cell cultures. *Macromol Biosci* 21:e2100125, 2021
21. Dankó T, Petővári G, Raffay R, et al. Characterisation of 3D bioprinted human breast cancer model for *in vitro* drug and metabolic targeting. *Int J Mol Sci* 23:7444, 2022
22. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 15:81–94, 2018
23. Chae S, Ha DH, Lee H. 3D bioprinting strategy for engineering vascularized tissue models. *Int J Bioprint* 9:748, 2023
24. You S, Xiang Y, Hwang HH, et al. High cell density and high-resolution 3D bioprinting for fabricating vascularized tissues. *Sci Adv* 9:eade7923, 2023
25. Gilmore AC, Flaherty SJ, Somasundaram V, et al. An *in vitro* tumorigenesis model based on live-cell-generated oxygen and nutrient gradients. *Commun Biol* 4:477, 2021
26. Grunewald L, Lam T, Andersch L, et al. A reproducible bioprinted 3D tumor model serves as a preselection tool for CAR T cell therapy optimization. *Front Immunol* 12:689697, 2021