

3D sferoidinių ląstelių kultūrų pritaikymas priešvėžinių vaistų tyrimuose

Application of 3D spheroid cell culture in anticancer drug discovery

Greta Jarockytė^{1,2}, Dominyka Dapkutė^{1,2}, Vitalijus Karabanovas^{1,3}, Justinas V. Daugmaudis⁴, Feliksas Ivanauskas⁴, Ričardas Rotomskis^{1,5}

¹Nacionalinis vėžio institutas, Biomedicininės fizikos laboratorija, Baublio 3B, LT-08406, Vilnius

²Gyvybės mokslų centras, Vilniaus universitetas, Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius

³Chemijos ir bioinžinerijos fakultetas, Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Saulėtekio al. 11, LT-10223, Vilnius

⁴Matematikos ir informatikos fakultetas, Vilniaus universitetas, Naugarduko g. 24, LT-0322, Vilnius

⁵Biofotonikos grupė, Lazerinių tyrimų centras, Vilniaus universitetas, Saulėtekio al. 9, LT-10222, Vilnius

greta.jarockyte@nvi.lt

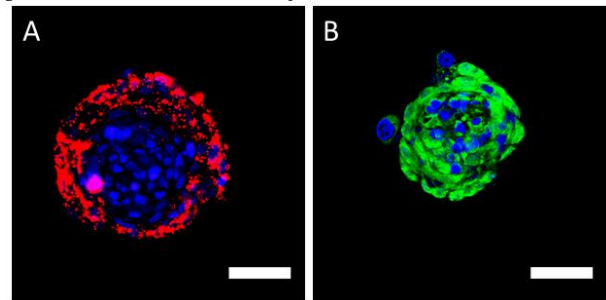
Šiuo metu biomediciniuose tyrimuose, kaip vėžinio audinio modelis, dažniausiai yra naudojami ląstelių monoslouksniai. Tačiau šis biologinis modelis yra per daug supaprastintas ir neatitinka sudėtingos vėžinio audinio struktūros bei naviko mikroaplinkos. Siekiant eksperimentines sistemas priartinti prie natūralių biologinių struktūrų, pradėtos auginti trimatės (3D) ląstelių kultūros. Tokiose ląstelių kultūrose dominuoja ląstelė-ląstelė sąveika, taip pat formuojasi tarpląstelinis užpildas ir susidaro difuzinis maisto medžiagų bei deguonies gradientas. Tokiomis pačiomis savybėmis pasižymi ir maži navikai, dar neturintys kraujagyslių tinklo. Visa tai suteikia pranašumą 3D ląstelių kultūroms onkologiniuose tyrimuose prieš šiuo metu įprastus ląstelių monoslouksnius, todėl nenuostabu, kad pastaraisiais metais sparčiai daugėja tyrimų su 3D ląstelių kultūromis. Tačiau vis dar trūksta fundamentalių tyrimų, kurie parodytų kaip įvairios medžiagos, pvz. vaistų molekulės, nanodalelės, susikaupia ir pasiskirsto 3D ląstelių kultūrose.

Šiame darbe 3D ląstelių kultūros buvo formuojamos kabančio lašo metodu, kuris leidžia užauginti sferoidines ląstelių kultūras. Ląstelių sferoidams formuoti buvo naudojamos žmogaus krūties vėžinės ląstelės MCF-7 ir į kamienines panašios krūties vėžinės ląstelės MDA-MB-231, taip pat pelių embriono fibroblastai NIH3T3. Kaip nanodalelių modelis buvo pasirinkti kvantiniai taškai (KT), kurie yra inertiški ir pasižymi ryškia fotoluminescencija raudonoje srityje ($\lambda_{\max}=625$ nm). Difuzijos proceso modeliavimui ląstelių sferoiduose buvo naudojamas fluorescencinis dažas rodaminas 6G (R6G) ($\lambda_{\max}=548$ nm). KT ir R6G susikaupimas ląstelių sferoiduose buvo tiriamas konfokalinio mikroskopu Nikon Eclipse Te2000-S bei tėkmės citometru BD Accuri™ C6. Eksperimentų metu gauti rezultatai buvo naudojami matematinio modelio kūrimui.

Atliktų eksperimentų rezultatai parodė, kad KT susikaupia MCF-7 ir MDA-MB-231 3D ląstelių kultūros paviršiuje, tačiau nesikaupia ląstelių sferoido centrinėje dalyje. MCF-7 suformuoja ne tvirtus sferoidus, o laisvus agregatus, todėl KT gali giliau prasiskverbti į ląstelių kultūrą. NIH3T3 ląstelės formuoja tvirtus sferoidus, KT susikaupimas yra panašus į susikaupimą MDA-MB-231 ląstelių sferoide. Iš anksčiau atliktų tyrimų su ląstelių monoslouksniais, žinome, kad KT į ląsteles patenka

endocitozės būdu [1], todėl stebėdami KT susikaupimą ląstelių sferoiduose galime modeliuoti, kaip kitos tokio dydžio nanodalelės elgsis 3D ląstelių kultūrose. Norint patvirtinti konfokalinio mikroskopu gautus rezultatus, buvo atlikta tėkmės citometrijos analizė, kuri parodė, kad 60 % MCF-7 ir 70 % MDA-MB-231 ląstelių sukaupė kvantinius taškus.

R6G ląstelėse susikaupia difuzijos būdu, todėl mažuose sferoiduose (100-300 μm) po 24 h R6G stebimas visose ląstelėse. Tačiau didesniuose nei 300 μm sferoiduose R6G susikaupimas po 24 h inkubacijos matomas tik paviršinėse ląstelėse sferoido periferijoje, o vidiniuose jo sluoksniuose susikaupimas nestebimas. Vadinasi, net ir difuziškai į ląsteles patenkančių medžiagų susikaupimas ląstelių sferoiduose yra ribojamas. Pritaikius difuziją aprašančio modelio lygtis, buvo apskaičiuotas KT prasiskverbimo į sferoidus gylis, sumodeliuota kaip keičiasi KT susikaupimas priklausomai nuo inkubacijos laiko.



1 pav. A) KT (raudona spalva) pasiskirstymas NIH3T3 ląstelių sferoido (apie 150 μm dydžio) vidiniame pjūvyje po 24 h inkubacijos. B) R6G (žalia spalva) pasiskirstymas NIH3T3 ląstelių sferoido (apie 100 μm dydžio) vidiniame pjūvyje po 24 h inkubacijos. Ląstelių branduoliai nudažyti su branduolių dažu Hoechst (mėlyna spalva). Skalė 50 μm .

Reikšminiai žodžiai: nanomedicina, 3D ląstelių kultūros, ląstelių sferoidai, nanodalelių kaupimasis, kvantiniai taškai.

Literatūra

[1] L. Damalakiene, V. Karabanovas, S. Bagdonas, M. Valius and R. Rotomskis, *Int J Nanomedicine*, 8, 555–568 (2013).