

Modele doświadczalne w badaniach onkologicznych. Część I. Sferoidy i model *in ovo*

Kaja Urbańska, Justyna Sokołowska

z Katedry Nauk Morfologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Badania z zakresu biologii komórek nowotworowych oraz ich potencjału proliferacyjnego i metastatycznego oraz odpowiedzi na podane chemioterapeutyki lub inne substancje o charakterze przeciwnowotworowym, jak również charakterystyka farmakodynamiki tych związków w komórkach transformowanych nowotworowo w pierwszym etapie badań przedklinicznych oraz w badaniach naukowych, przeprowadzane są w warunkach *in vitro*. W tym celu wykorzystuje się komercyjnie dostępne linie komórek nowotworowych, pozyskane z banków linii komórkowych: ECACC (European Collection of Cell Cultures) lub ATCC (American Type Culture Collection) bądź wyprowadza się taką linię z guza pobranego śródoperacyjnie.

Badania w warunkach *in vitro* mają jednak swoje ograniczenia, co sprawia, że interpretacja wyników końcowych bywa trudna i nie zawsze odzwierciedla odpowiedź komórek nowotworowych wzrastających *in vivo*. Jest to związane przede wszystkim z tym, że większość komercyjnie dostępnych linii nowotworowych wprowadza się, wykonując seryjne pasaże i prowadząc selekcję komórek w kierunku pożądanych cech, takich jak ekspresja określonych genów, określone cechy morfologiczne i funkcje. Podczas tego kontrolowanego wzrostu komórki nowotworowe nabywają cech fenotypowych, które pozwalają im zaadaptować się do warunków *in vitro* (1). Ponadto w hodowlach jednowarstwowych (typu monolayer) komórki mają zapewniony łatwy dostęp

do składników odżywczych i tlenu, w wyniku czego powstaje jednolita pod względem genotypowym i fenotypowym populacja komórek (2). Należy podkreślić, że komórkom nowotworowym hodowanym w takich warunkach brakuje złożoności budowy guza wzrastającego w warunkach *in vivo*, w tym unaczynienia i obecność komórek zapalnych (3). Hodowla komórkowa pozbawiona jest również macierzy zewnątrzkomórkowej (4). Stwarza to konieczność poszukiwania innych modeli doświadczalnych do badań onkologicznych, na których można byłoby prowadzić badania z zakresu biologii nowotworów, jak również określać odpowiedź komórek nowotworowych na podawane substancje przeciwnowotworowe.

Sferoidy

W ocenie skuteczności działania leków przeciwnowotworowych lub innych substancji o potencjalnym charakterze supresorowym coraz częściej wykorzystuje się sferoidy (hodowle trójwymiarowe – 3D) – agregaty komórek nowotworowych, które hoduje się w warunkach *in vitro*. Wielokomórkowe sferoidy nowotworowe wykazują cechy guza wzrastającego w warunkach *in vivo* we wczesnej fazie

Experimental models in cancer research. Part I. Spheroids and *in ovo* model

Urbańska K., Sokołowska J., Department of Morphological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Science – SGGW

The purpose of this article was to present the novel approach for studying cancer under controlled laboratory conditions. Development of cancer is a complex biological process that requires comprehensive experimental systems for the investigations. Until recently, cancer research was based on the use of neoplastic cell lines as *in vitro* experimental models to study biology of tumor cells. These models however, do not reflect all features of human tumors. It has created the necessity of developing more appropriate *in vitro* models. Here two novel models, namely: multicellular tumor spheroids and chick chorioallantoic membrane, are described. They both constitute more realistic insight to the structural architecture and differentiated functions of human cancer cells and they could be successfully introduced into the research. These models provide a valuable, reliable alternatives to currently used animal models in studying the growth of mammalian tumors and tumor angiogenesis. They will also allow to minimize the number of animals used in preclinical trials in medical experiments.

Keywords: tumor *in vitro* models, tumor spheroids, *in ovo* model.

jego wzrostu i dlatego uważane są za formę pośrednią pomiędzy komórkami z hodowli typu jednowarstwowego a guzem wzrastającym spontanicznie (4, 5, 6). Pod względem morfologicznym hodowle komórkowe w kulturach 3D, a zwłaszcza sferoidy, składają się z komórek o zróżnicowanym fenotypie, będących w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego, proliferujących oraz umiejscowionych w środku sferoidu komórek objętych zmianami martwiczymi (2, 7), gdyż ciśnienie parcjalne tlenu maleje w kierunku centralnej części sferoidu. Komórki dzielące się występują głównie w 3–5 warstwach zewnętrznych, natomiast komórki znajdujące się w fazie spoczynkowej – w pobliżu obszarów centralnych (4). Oprócz zbliżonej do guzów pobranych śródoperacyjnie morfologii, podobieństw sferoidów do guzów powstających spontanicznie należy również upatrywać w oddziaływaniach komórka-komórka, wewnątrzkomórkowych szlakach sygnałowych i ekspresji genów. Odpowiedź sferoidów i guzów wzrastających w warunkach *in vivo* na podane substancje przeciwnowotworowe jest zbliżona. Dawka IC_{50} (inhibitory concentration, dawka substancji

powodująca 50% maksymalnej inhibicji) komórek rosnących w formie jednowarstwowej, w klasycznych hodowlach 2D, jest niższa (7).

W celu ustalenia optymalnej dawki radioterapii oraz jej skutków na aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych sferoidy, po ich uprzednim napromienieniu, można także wszczepiać do mózgu dojrzałych płciowo szczurów (8). Domózgowe transplantacje sferoidów przeprowadza się także na płodach szczurzych (9). W badaniach nad angiogenezą w nowotworach sferoidy implantuje się również na błonę kosmówkowo-omocznową zarodków ptaków w hodowlach *ex ovo*. Rozpatrując wykorzystywanie sferoidów do tego typu doświadczeń należy wziąć pod uwagę rozmiar mikroguza. Uważa się, że najlepsze rezultaty, wyrażone m.in. wysokim potencjałem angiogennym formującego się w takich warunkach guza, otrzymuje się przeszczepiając sferoidy o rozmiarach od 500 μm do 1 mm (10). Ograniczenia wykorzystywania sferoidów do badań nad biologią nowotworów związane są z brakiem oddziaływań o charakterze parakrynnym pomiędzy komórkami guza a komórkami gospodarza. Na przykład braku wpływu czynników wzrostowych, oddziaływań pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami układu krwiotwórczego lub komórkami nabłonkowymi oraz stresem komórek, który jest związany z ich hodowlą w nieograniczonej przestrzeni. Warto podkreślić, że hodowla sferoidów nie jest wskazana w przypadku komórek, które fizjologicznie przyjmują formę jednowarstwy, np. komórek nabłonka jelita grubego (6).

Hodowle *in ovo*

W ostatnich latach nastąpił znaczący wzrost zainteresowania badaniami na zarodkach ptasich, na których przeprowadza się badania embriologiczne (11), toksykologiczne (12), a także onkologiczne. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że model ten jest z powodzeniem stosowany do oceny skuteczności działania substancji o charakterze przeciwnowotworowym (13), jak również do badań nad mechanizmami angiogenezy w nowotworach (14) różnego pochodzenia.

Pierwsze opublikowane wyniki próby przeszczepiania komórek nowotworów złośliwych ssaków na błonę kosmówkowo-omocznową (chorioallantoic membrane – CAM) zarodków kury domowej pochodzą z 1912 r. (15), jednak rozwój prac traktujących o przydatności modelu *in ovo* do badań nad angiogenezą przypadł na przełom XX i XXI wieku (16). Z dostępnych źródeł wynika, że na błonie

kosmówkowo-omocznowej zarodków ptaków można hodować odpowiednio przygotowane komórki nowotworowe pozyskane śródoperacyjnie, np. gwiaździanka anaplastycznego, glejaka wielopostaciowego, skąpodrzewianka, oponianka, wyściółczaka i rdzeniaka (17). Innymi, szczególnie pre-dysponowanymi do wzrostu na modelu *in ovo* nowotworami są: kostniakomięsak (18), rak gruczołu krokowego (19), jak również złośliwe nowotwory układu hematopoetycznego, w tym chłoniaki (20). Modelami wykorzystywanymi w doświadczalnych badaniach onkologicznych są zarodki kury domowej: leghorn biały (21, 22, 23, 24) oraz ross 308 (25), a także przepiórki (26).

Błona kosmówkowo-omocznowa formuje się czwartego dnia rozwoju zarodkowego ptaka, poprzez połączenie kosmówki i omocznia. Szybkie tempo proliferacji komórek śródbłonka i różnicowanie naczyń krwionośnych oplatających tę błonę postępuje do 11 dnia życia zarodka (14). Błona kosmówkowo-omocznowa zbudowana jest z trzech warstw: ektodermy, która przylega do skorupy jaja, mezodermy pokrytej siecią naczyń krwionośnych i składnikiem podścieliska oraz endodermy położonej od strony jamy omocznia. Grubość wszystkich trzech warstw rzadko przekracza 100 μm (16). Błona kosmówkowo-omocznowa pełni funkcję narządu oddechowego zarodka, rezerwuaru produktów jego przemiany materii, a także transportuje elektrolity (sód i chlorki) z omocznia i wchłania jony wapnia ze skorupy jaja, które są niezbędne w procesie mineralizacji kości rosnącego zarodka. Rozpatrując możliwości uznania zarodków ptasich za potencjalny model wykorzystywany w trakcie koniecznych doświadczalnych badań onkologicznych należy nadmienić, że układ immunologiczny zarodka ptaka nie jest kompletnie rozwinięty aż do 10 dnia rozwoju. Obecność limfocytów B stwierdza się dopiero w 11 dniu rozwoju zarodkowego, natomiast limfocyty T we krwi obwodowej pojawiają się w 12 dniu. Z uwagi na lokalizację i łatwy dostęp do naczyń krwionośnych zarodka ptaka, jak również późny rozwój jego układu immunologicznego, implantacja komórek nowotworowych na błonę kosmówkowo-omocznową jest zabiegiem prostym technicznie i obciążonym niewielkim ryzykiem odrzucenia przeszczepu (27). Wydaje się, że jedynym czynnikiem ograniczającym znaczenie metody *in ovo* w badaniach onkologicznych są różnice w metabolizmie ptaka (biorcy komórek nowotworowych) i ssaka (dawcy tych komórek), a ściślej dotyczy to zjawiska lekooporności, choćby wrażliwości na chlormetynę, związku, na który ptaki są odporne (22).

Implantacji komórek nowotworowych zawieszonych w medium hodowlanym dokonuje się w miejscu występowania naczyń krwionośnych błony kosmówkowo-omoczniovej. Po zabiegu jaja zabezpiecza się plastrem przepuszczającym powietrze i ponownie umieszcza w aparacie lęgowym (25). Formowanie guza rozpoczyna się już 2–5 dni po inokulacji komórek nowotworowych; wkrótce potem guz zaczyna oplatać naczynia krwionośne. Proces angiogenezy obejmuje też mięsz nowotworu. Tak rozpoczyna się faza szybkiego wzrostu nowotworu (27). W zależności od pochodzenia i liczby przeszczepianych komórek nowotworowych, jak również ich aktywności proliferacyjnej, formujące się nowotwory osiągają masę nawet 500–600 mg już w niecały tydzień po implantacji. W tym czasie komórki nowotworowe mogą opuścić pierwotne ognisko i tworzyć mikroprzerzuty w narządach zarodka (16). W miejscu implantacji komórek nowotworowych stwierdza się silny obrzęk błony kosmówkowo-omoczniovej (28). Opisywano także przeszczep komórek ludzkiej linii kostniakomięsaka na błonę kosmówkowo-omoczniową w miejsce, w którym nie występowały naczynia krwionośne (29), a także wszczepianie komórek nowotworowych do woreczka żółtkowego zarodka (22). Komórki nowotworowe pochodzenia astrocytarnego można implantować także do komór mózgu zarodków ptaków. Morfologia tak uzyskanych guzów jest podobna do guzów powstających z przeszczepionych komórek tych samych linii do mózgu gryzoni laboratoryjnych (21).

Skuteczność hodowli nowotworów w warunkach *in ovo* zależy m.in. od liczby komórek nowotworowych, które pasażuje się na błonę kosmówkowo-omoczniową zarodka ptaka. Jak wynika z badań, wraz ze wzrostem stężenia inokulowanych komórek maleje współczynnik przeżycia zarodków ptaków. Powodzenie hodowli komórek nowotworowych na modelu *in ovo* uwarunkowane jest także odpowiednim momentem pasażu komórek na błonę kosmówkowo-omoczniową (29). Innym czynnikiem limitującym jest rodzaj nowotworu. Najintensywniejszy rozwój guza obserwuje się po wszczepieniu nowotworów łagodnych, które nie są pochodzenia neuroektodermalnego, np. oponiak. Dynamika wzrostu glejaka jest znacznie mniejsza, jakkolwiek glejaki o większym stopniu złośliwości rosną szybciej w porównaniu do guzów sklasyfikowanych jako mniej złośliwe (17). Za pozytywny wynik doświadczenia z wykorzystaniem błony kosmówkowo-omoczniowej do hodowli komórek nowotworowych uznaje się obecność guzów o rozmiarach

powyżej 2 mm, z widocznym obszarem waskularyzacji na jego powierzchni (27). Zakoczenie hodowli nowotworu z wykorzystaniem zarodków ptasich przeprowadza się 17, 18, 19 lub 20 dnia rozwoju zarodkowego (23, 25), choć opisano także przypadki wykluczenia się piskląt z zaimplantowanymi wcześniej komórkami nowotworowymi (21). Wydaje się, że decydujący wpływ na morfologię guza uformowanego w wyniku implantacji komórek nowotworowych na błonę kosmówkowo-omoczniową (a także w innych układach doświadczalnych, na przykład do mózgu gryzoni laboratoryjnych) ma rodzaj wykorzystanej linii nowotworowej. Nie wszystkie dostępne komercyjnie linie mają bowiem fenotyp guza pierwotnego. Za predykcijną linię nowotworową chętnie wykorzystywaną w badaniach przedklinicznych uznaje się np. U251, której komórki, a także guz z nich uformowany wykazuje wszystkie najważniejsze cechy genetyczne i fenotypowe glejaka wzrastającego spontanicznie (30). W warunkach *in ovo* można także hodować fragmenty guzów pozyskanych śródoperacyjnie (31, 32).

Podsumowanie

Zasadność wykorzystywania zwierząt do badań onkologicznych od lat wzbudza kontrowersje. Wydaje się, że badania w warunkach *in vitro* stanowią alternatywę dla badań na zwierzętach. Dzięki zastosowaniu tego rodzaju modeli doświadczalnych można prowadzić prace m.in. nad genami i szlakami molekularnymi zaangażowanymi w proces onkogenyzy czy pewne badania dotyczące oceny skuteczności substancji o działaniu przeciwnowotworowym. Jednakże takie układy doświadczalne nie są w stanie odtworzyć wielu skomplikowanych interakcji jakie zachodzą pomiędzy komórkami wzrastającego guza nowotworowego a organizmem gospodarza, takie jak oddziaływanie na poziomie komórka-podścielisko guza, reakcji układu odpornościowego czy działań niepożądanych nowych leków przeciwnowotworowych. Stąd też nie da się całkowicie wykluczyć badań prowadzonych na zwierzętach.

Piśmiennictwo

1. Pinho S.S., Carvalho S., Cabral J., Reis C.A., Gärtner F.: Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl. Res.* 2012, **159**, 165–172.
2. Zhang X., Wang W., Yu W., Xie Y., Zhang X., Zhang Y., Ma X.: Development of an *in vitro* multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnol. Prog.* 2005, **21**, 1289–1296.
3. Becher O.J., Holland E.C.: Genetically Engineered Models Have Advantages over Xenografts for Preclinical Studies. *Cancer Res.* 2006, **66**, 3355–3358.

4. Madsen S.J., Sun C.H., Tromberg B.J., Cristini V., De Magalhães N., Hirschberg H.: Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 2006, **38**, 555–564.
5. Anada T., Masuda T., Honda Y., Fukuda J., Arai F., Fukusa T., Suzuki O.: Three-dimensional cell culture device utilizing thin membrane deformation by decompression. *Sens. Actuators B. Chem.* 2010, **147**, 376–379.
6. Santini M.T., Rainaldi G., Indovina P.L.: Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000, **36**, 75–87.
7. Kim J.B.: Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* 2005, **15**, 365–377.
8. Thorsen F., Enger P.Ø., Wang J., Bjerkgvig R., Pedersen P.H.: Human glioblastoma biopsy spheroids xenografted into the nude rat brain show growth inhibition after stereotactic radiosurgery. *J. Neurooncol.* 2007, **82**, 1–10.
9. Khoshyomn S., Penar P.L., McBride W.J., Taatjes D.J.: Four-dimensional analysis of human brain tumor spheroid invasion into fetal rat brain aggregates using confocal scanning laser microscopy. *J. Neurooncol.* 1998, **38**, 1–10.
10. De Magalhães N., Liaw L.-H.L., Berns M.: An instruction on the *in vivo* shell-less chorioallantoic membrane 3-dimensional tumor spheroid model. *Cytotechnology.* 2010, **62**, 279–283.
11. Waldo K.L., Willner W., Kirby M.: Origin of the proximal coronary artery stems and a review of ventricular vascularization in the chick embryo. *Am. J. Anat.* 1990, **188**, 109–120.
12. Prakash Reddy N.C., Anjaneyulu Y., Sivasankari B., Ananda Rao K.: Comparative toxicity studies in birds using nimesulide and diclofenac sodium. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006, **22**, 142–147.
13. Uchibayashi T., Egawa M., Nakajima K., Hisazumi H., Tanaka M., Endo Y., Sasaki T.: Responses of tumour cell lines implanted onto the chorioallantoic membrane of chick embryo to anticancer agents in combination with hyperthermia. *Urol. Res.* 1992, **20**, 233–239.
14. Ribatti D.: Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2008, **270**, 181–224.
15. Murphy JB, Rous P.: The behavior of chicken sarcoma implanted in the developing embryo. *J. Exp. Med.* 1912, **15**, 119–132.
16. Deryugina E.I., Quigley J.P.: Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cells metastasis. *Histochem. Cell Biol.* 2008, **130**, 1119–1130.
17. Shoin K., Yamashita J., Enkaku F., Sasaki T., Tanaka M., Endo Y.: Chick embryo assay as chemosensitivity test for malignant glioma. *Jpn. J. Cancer Res.* 1991, **82**, 1165–1170.
18. Balke M., Neumann A., Kersting C., Agelopoulos K., Gebert C., Gosheger G., Buerger H., Hagedorn M.: Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Res. Notes.* 2010, **3**, 58.
19. Kunzi-Rapp K., Genze F., Küfer R., Reich E., Hautmann RE, Gschwend JE.: Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *J. Urol.* 2001, **166**, 1502–1507.
20. Grinberg I., Reis A., Ohana A., Taizi M., Cipok M., Tavor S., Rund D., Deutsch V.R., Goldstein R.S.: Engraftment of human blood malignancies to the turkey embryo: a robust new *in vivo* model. *Leuk. Res.* 2009, **33**, 1417–1426.
21. Cretu A., Fotos J.S., Little B.W., Galileo D.S.: Human and rat glioma growth, invasion, and vascularization in a novel chick embryo brain tumor model. *Clin. Exp. Metastasis.* 2005, **22**, 225–236.
22. Dagg C.P., Karnofsky D.A., Roddy J.: Growth of transplantable human tumors in the chick embryo and hatched chick. *Cancer Res.* 1956, **16**, 589–597.
23. Durupt F., Koppers-Lalic D., Balme B., Budel L., Terrier O., Lina B., Thomas L., Hoeben R.C., Rosa-Calatrava M.: The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther.* 2012, **19**, 58–68.
24. Mangieri D., Nico B., Coluccia AM, Vacca A, Ponzoni M, Ribatti D.: An alternative *in vivo* system for testing

Prace poglądowe

- angiogenic potential of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* 2009, **277**, 199-204.
25. Szmidt M., Urbańska K., Grodzik M. Orłowski P., Sawosz E., Wierzbicki M., Sysa P.: Morphology of human glioblastoma model cultured In ovo. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2012, **56**, 261-266
26. Papoutsis M, Sleeman JP, Wilting J.: Interaction of rat tumor cells with blood vessels and lymphatics of the avian chorioallantoic membrane. *Microsc. Res. Tech.* 2001, **55**, 100-107.
27. Vargas A., Zeisser-Labouèbe M., Lange N., Gurny R., Delie F.: The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, **59**, 1162-1176.
28. Hagedorn M., Javerzat S., Gilges D., Meyre A., de Lafarge B., Eichmann A., Bikfalvi A.: Accessing key steps of human tumor progression *in vivo* by using an avian embryo model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, **101**,1643-1648.
29. Wang J., Wang L., Cai L: Establishment of a transplantation tumor model of human osteosarcoma in chick embryo. *Chin-Ger. J. Clin. Oncol.* 2009, **8**, 531-536.
30. Radaelli E., Ceruti R., Patton V., Russo M., Degrassi A., Croci V., Caprera F., Stortini G., Scanziani E., Pesenti E., Alzani R.: Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histol. Histopathol.* 2009, **24**, 879-891.
31. Balčiūnienė N., Tamašauskas A., Valančiūtė A., Deltuva V. Vaitiekaitis G., Gudiniavičienė I., Weis J., Graf von Keyserlingk D.: Histology of human glioblastoma transplanted on chicken chorioallantoic membrane. *Medicina (Kaunas).* 2009, **45**, 123-131.
32. Teresevičiūtė N., Tamasauskas A., Valanciūte A., Deltuva V., von Graf K.D.: Evaluation of morphological issues of central nervous system glioblastoma on chicken embryo chorioallantoic membrane. *Pol. J. Vet. Sci.* 2007,**10**, 173-178.

Mgr Kaja Urbańska, Zakład Histologii i Embriologii,
Katedra Nauk Morfologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, e-mail: kaja.urbanska@onet.eu