

UPORABA *IN VITRO* IN *IN VIVO* MODELOV OSTEOSARKOMA ZA VREDNOTENJE ELEKTROKEMOTERAPIJE

Saša Kupčič, Urša Lampreht Tratar, Urška Kamenšek, Gregor Serša, Maja Čemažar

Onkološki inštitut Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Osteosarkom (OS) je eden najpogostejših primarnih rakov kosti pri ljudeh. Pojavlja se večinoma pri najstnikih in mladih odraslih. Primarno zdravljenje vključuje kirurški poseg in adjuvantno kemoterapijo. Petletno preživetje oseb s takim zdravljenjem je 70 %, pri bolnikih s pljučnimi metastazami pa le okoli 25 %. Elektrokemoterapijo so že uporabljali za zdravljenje kostnih metastaz, kjer se je izkazala kot zmerno uspešna pri zmanjševanju bolečine, vendar pa v teh primerih uporabljeni protokol zdravljenja ni bil prilagojen posebnostim kostnega tkiva. Za oceno elektrokemoterapije kot potencialnega zdravljenja OS smo morali najprej vzpostaviti ustrezen napovedni model bolezni. Uporaba različnih celičnih in živalskih modelov je ključnega pomena, kadar želimo pridobiti celovito razumevanje učinkovitosti in varnosti izbrane terapije. Zato smo v okviru te študije razvili 2D in 3D celične modele iz celične linije K7M2 za mišji OS in ortotopski mišji model *in vivo* s celično linijo K7M2-luc, ki izraža luciferazo. Za začetne preizkuse citotoksičnosti smo uporabili 2D celični model, ki pa kot drugi 2D modeli v celoti ne povzema ključnih lastnosti solidnih tumorjev, vključno z njihovo odpornostjo na citostatike. V ta namen smo vzpostavili tudi 3D večcelični tumorski sferoidi, saj njihova arhitektura spodbuja celično organizacijo, diferenciacijo in komunikacijo. Ti procesi vodijo do razvoja sferoidnega mikrookolja, ki povzema lastnosti *in vivo* čvrstih neožiljenih tumorjev; kinetiko rasti, presnovne procese in odpornost na citostatike. V rotacijskem inkubatorju Clinostar® smo gojili sferoide z različnim številom nasajenih celic ter jih iz inkubatorja odvzeli v različnih časovnih točkah. Nato smo določili odstotek apoptotičnih/nekrotičnih celic. Sferoidi, oblikovani iz 5000 celic in gojeni 1 teden, so bili izbrani kot primeren model za nadaljnje študije. Ker se tumorji OS običajno razvijajo na mestih intenzivne rasti kosti, kjer komunicirajo z elementi kostnega mikrookolja, je bila za ugotavljanje protitumorske učinkovitosti elektrokemoterapije potrebna uporaba ortotopičnega mišjega modela. Implantacija celic na isto anatomsko mesto kot ustrezni humani rak (v tem primeru proksimalni del golenice) v primerjavi s standardnimi ektopičnimi (podkožnimi) modeli natančneje posnema mikrookolje in celične interakcije, ki jih najdemo v humanih tumorjih. Za študije *in vivo* smo celično linijo K7M2 najprej transducirali z genom za luciferazo. Celice smo nato z iglo 29G inokulirali v proksimalni del golenice tako, da smo z iglo prebili pokostnico in prišli v medularno območje, kamor smo injicirali celično suspenzijo. Rast tumorjev smo enkrat tedensko spremljali z In Vivo Imaging System (IVIS). Opazovali smo tako jakost bioluminiscenčnega signala, kot napredovanje degradacije kosti na mestu nasajenega tumorja. Miši smo evtanazirali približno 6 tednov po inokulaciji, ko je bila vidna liza kosti in so bili ugotovljeni klinični znaki, značilni za napredovano bolezen, kot so šepanje, hujšanje in dihalna stiska. Ta je bila prav tako pokazatelj razvoja za osteosarkom značilnih pljučnih metastaz. V okviru te študije smo uspeli vzpostaviti ustrezne modele *in vitro* in *in vivo* za nadaljnje raziskave.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru raziskovalnega programa P3-0003, ki ga financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) ter internega projekta Onkološkega inštituta Ljubljana.

p11