

Joonas Matikainen, Katja Korelin ja Tuula Salo

Esimerkinä suun ja nielun syöpien kemosädehoidon in vitro -testausmenetelmät

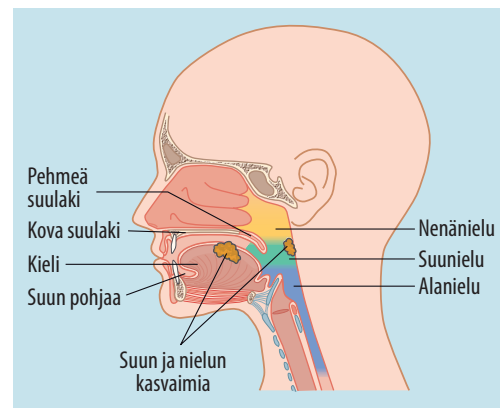
Parantaisiko ihmiskasvainmatriksi syöpäsolujen läikehoitovasteen määrityksen luotettavuutta?

Syöpälääketutkimus etsii jatkuvasti uusia lääkkeitä, jotta suun ja nielun syöpää sairastavien potilaiden ennuste paranisi. Prekliiniset syöpälääketutkimukset ennustavat heikosti lääkkeen kliinistä hoitovastetta. Syöpäsoluja on kasvatettu muovialustalla ja lääkkeiden tehoa analysoitu solujen jakaantumisen estymisen ja apoptoosin lisääntymisen perusteella. Syöpäsolujen kasvatus kasvainperäisen solunulkoisen matriksin päällä, tai sen sisällä, jäljitteli muovialustakasvatusta paremmin syövän mikroympäristöä. Esittelemme eri lääketestausmenetelmiä, ja erityisesti ihmisen kasvaimen mikroympäristöä jäljittelevän matriksin, kohdun myoomista valmistetun myogeelin, soveltuvuutta syöpälääketutkimuksiin.

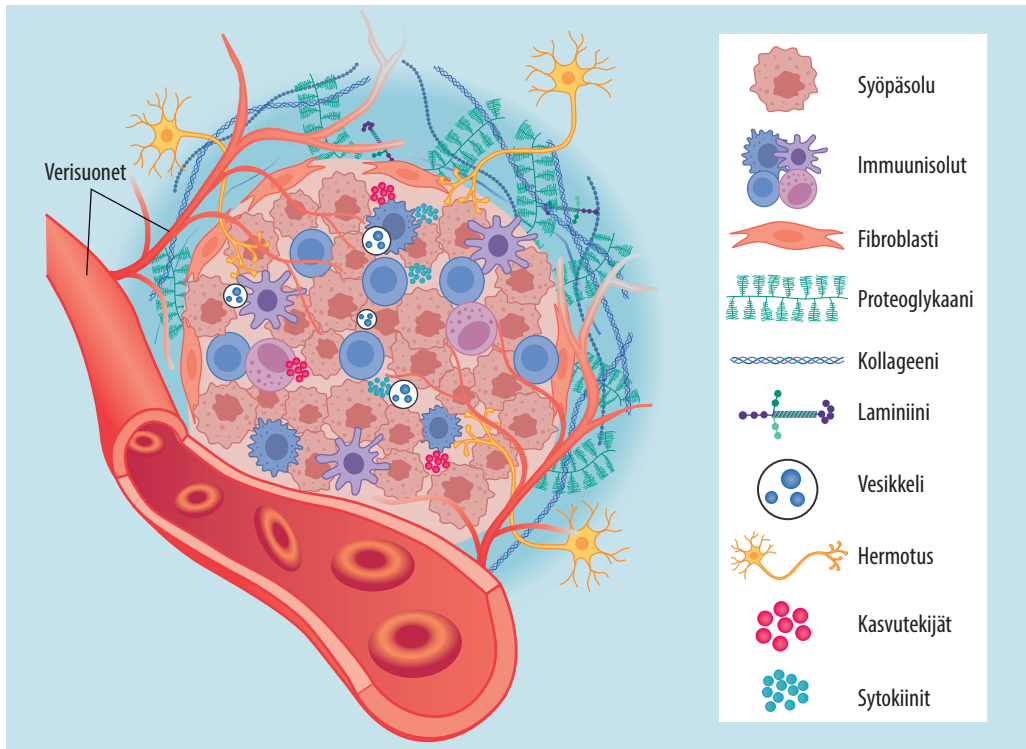
Pään ja kaulan levyepiteelikarsinomat (HNSCC) ovat maailmanlaajuisesti kahdeksanneksi yleisin syöpätyyppi, ja niistä 90 % on suun ja nielun levyepiteelikarsinomia (KUVA 1) (1,2). Yhä noin puolet sairastuneista menehtyy tautiin viiden vuoden seurannan aikana (3). Suun ja nielun karsinomia hoidetaan syövän sijainnin ja levinneisyysasteen mukaan kirurgisesti, sädehoidolla, kemoterapialla, täsmälääkkeellä ja immuunihoidolla sekä näitä hoitomuotoja yhdistelemällä. Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirasto FDA on hyväksynyt 12 lääkettä HNSCC:n hoitoon. Näistä yhdeksän on kemoterapialääkkeitä (4). Tavanomaisen kemoterapian lisäksi muita läikehoitomuotoja ovat epidermaalisen kasvutekijän reseptorin (EGFR) estoon perustuva täsmälääkehoito, setuksimabi, sekä T-solujen PD-1-reseptorin estoon perustuva immuunihoido pembrolitsumabilla ja nivolumabilla (4).

Useat prekliiniset in vitro -syöpälääketutkimukset ennustavat heikosti lääkkeen kliinistä hoitovastetta, ja vain noin 10 % prekliinisesti tehokkaiksi osoitetuista syöpälääkeaihoista päätyy kliiniseen läikehoitoon (5). Sen lisäksi, että eläinkokeiden käyttöä pitäisi eettisten syi-

den takia minimoida, on eläinkokeiden todettu ennustavan varsin huonosti ihmisen syöpälääkevastetta. Eläinkokeiden käytölle ei ole lainmukaistakaan perustetta, sillä vuonna 2022 hyväksytyn lain mukaan FDA ei enää edellytä uusilta läikeaineilta eläinkokeita ennen kliinisiin kokeisiin siirtymistä (6). Eläinkoevaatumuksen poistuessa tarve ihmisen elimistöä paremmin mallintaville menetelmille lisääntyy, mutta in vitro -kokeissa kiinteistä syöivistä eristettyjen



KUVA 1. Suun ja nielun syövät ovat tyypillisesti suun ja nielun limakalvosta sekä kielen pinnasta alkunsa saaneita levyepiteelikarsinomia.



KUVA 2. Syövän mikroympäristössä on syöpäsolujen lisäksi useita eri solutyyppiä, kuten immuunisoluja, sidekudossoluja sekä endoteelisoluja. Syöpäkudoksen solut erittävät ympärilleen solunulkoisen tukirangan eli kudostatriksin sekä yksilöllisen sekoituksen vesikkeleitä, kasvutekijöitä ja sytokiineja, jotka aktivoivat syöpäsolujen kasvua ja leviämistä.

solujen kasvatus on osoittautunut vaativaksi, eivätkä solut käyttäydy kuten fysiologisessa ihmiskudoksessa (7). Syöpäsolukasvatuksen ongelmia pyritäänkin ratkaisemaan kehittämällä menetelmiä, jotka jäljittelevät mahdollisimman hyvin syövän mikroympäristöä.

Syövän mikroympäristö

Kiinteissä syövässä syöpäsoluja ympäröivä soluväliaine, mikroympäristö, vaikuttaa oleellisesti syöpäsolujen jakaantumiseen, invaasioon, metastasointiin, immuunijärjestelmään ja lääkeaineiden resistenssin muodostumiseen (8). Solunulkoisen matriksin on syövän mikroympäristön tukirakenne. Se sisältää muun muassa kollageeneja, fibronektiiniä, laminiineja ja glykoproteiineja sekä vaikuttaa syövän kehittymiseen ja etenemiseen (9). Mikroympäristössä on syöpäsolujen ja solunulkoisen matriksin lisäksi myös muita solutyyppiä, joista tärkeimpiä ovat syöpäkudoksen fibroblastit (cancer

associated fibroblasts, CAF-solut), immuunisolut sekä solujen erittämät vesikkelit viestimolekyyliaine (KUVA 2) (10).

CAF-soluja esiintyy suurimmassa osassa kiinteiden syöpien mikroympäristössä (10). Ne voivat edistää syövän leviämistä muokkaamalla solunulkoista matriksia, jolloin syöpäsolukko pystyy läpäisemään tyvikalvon ja leviämään sidekudokseen (11,12). CAF-solut vapauttavat myös kasvutekijöitä ja kemokiineja, jotka houkuttelevat kasvaimen angiogeneesiä lisääviä ja immuunivastetta muokkaavia soluja (13). Syöpä- ja CAF-solut viestivät muiden solujen kanssa solukalvosta kuroutuneiden rakkuloiden eli solunulkoisten vesikkelien ja muiden viestimolekyylien välityksellä (11,14,15).

Immuunisolut osallistuvat syövän eri vaiheisiin vaikuttamalla syöpää estävien ja aktivoivien immuunitekijöiden tasapainoon (16). Tavallisesti immuunisolut pyrkivät tuhoamaan onkogeneesiä mutaatioita sisältäviä soluja, mutta syöpäsolut kykenevät hämäämään immuun-

nipuolustusta tuottamalla PD-L1-pintaproteiinia, johon immuunisolut sitoutuvat omalla pintaproteiinillaan (PD-1) (17). Sitoutuminen vähentää immuunireaktioita, jolloin syövän mikroympäristö muuttuu syövän kehitykselle suotuisammaksi.

Angiogeneesi eli verisuonten uudismuodostus edistää ravinteiden ja hapen saantia sekä syövän kehitystä (18). Syöpäsolukon verisuonitus on kuitenkin epänormaalia, ja siinä saattaa olla epätavallisia haarautumisia, laajenemisia, kudosten ja plasman vuotoja sekä endoteelisolujen apoptoosia (18). Vaskulogeeninen matkiminen (vascular mimicry) on joissakin aggressiivisissa syövässä esiintyvä ominaisuus, jossa syöpäsolut muodostavat verisuonten kaltaisia rakenteita (19). Nämä rakenteet mahdollistavat syöpäkudoksen ravinteiden ja hapen saannin ilman endoteeliperäistä angiogeneesiä (19).

Peri- ja intraneuraalisessa invaasioissa syöpäsolut etenevät hermokudoksen kautta. Pään ja kaulan alueen syövässä varsinkin intraneuraalinen invaasio huonontaa syövän ennustetta (20). Hermoinvaasioon kohdennettua lääkettä ei vielä ole saatavilla.

Muovista matriksiin

Kiinteästä syöpäkudoksesta eristettyjä syöpäsoluja on kasvatettu helppouden, edullisuuden ja nopeuden vuoksi muovialustan päällä, mutta tästä kaksiulotteisesta (2D) viljelymallista puuttuu useita syöpäkudoksen ominaisuuksia (21). Kasvatuksella ei pystytä mallintamaan syöpäkudoksen monimuotoista järjestäytymistä, esimerkiksi eri solujen välisiä tai solujen ja syövän mikroympäristöön liittyviä vuorovaikutuksia (21). Kolmiulotteisissa (3D) soluviljelymalleissa soluja kasvatetaan solunulkoisessa matriksissa tai sen päällä, toisin kuin 2D-malleissa, joissa solut kasvavat kiinnittyneenä muovialustaan.

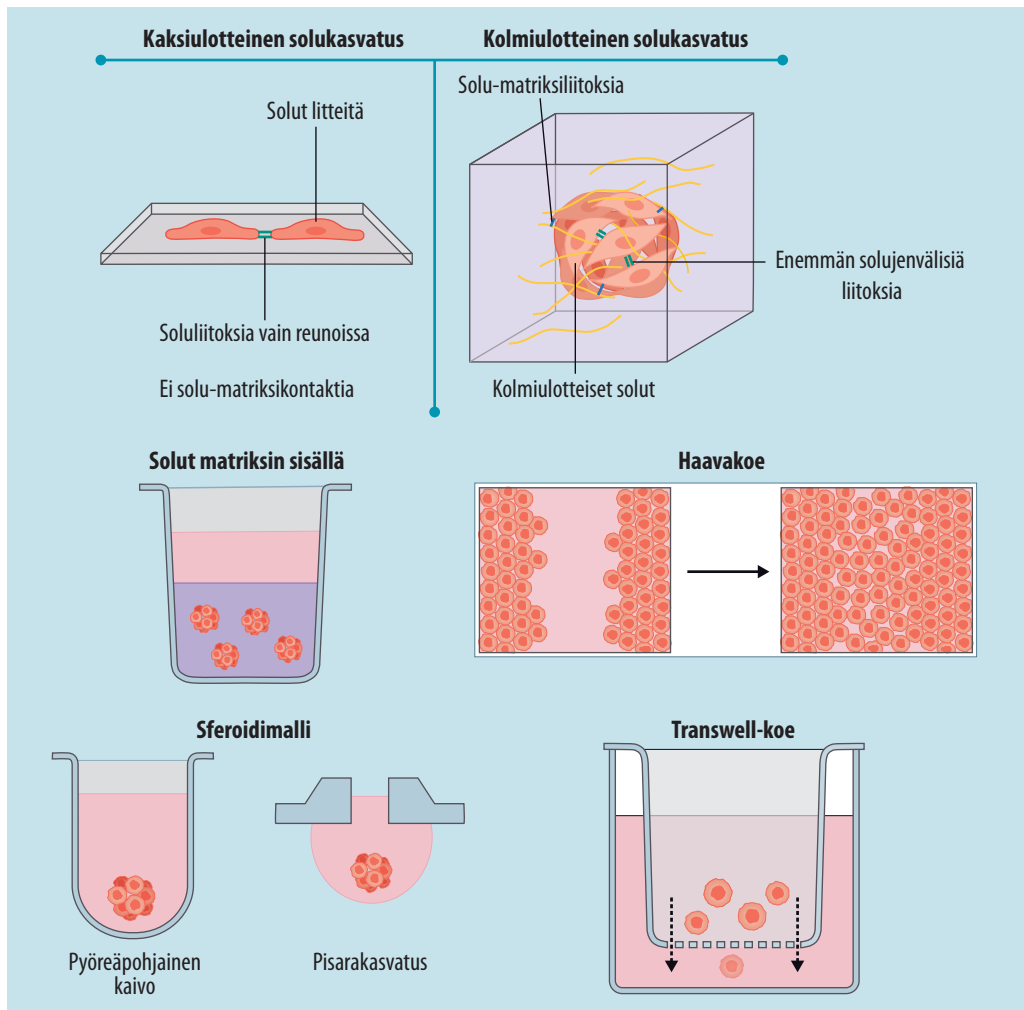
Tavallisimmat 3D-soluviljelyssä käytetyt biologiset matriksit ovat eläinperäisiä, esimerkiksi hiirestä eristetty matrigeeli ja rotan hännästä valmistettava tyypin I kollageeni (22). Matrigeeli ja sen vastaavat uudemmat tuotteet, kuten Cultrex, valmistetaan hiiren Engelbreth-

Holm-Swarmin sarkoomasta (22). Matrigeelissä on pääosin tyvikalvokomponentteja, kuten laminiinia, tyypin IV kollageenia ja fibronectiinia sekä kasvutekijöitä, jotka säätelevät solujen homeostaasia, erilaistumista ja kasvua (22). Matrigeeliä käytetään maailmanlaajuisesti syöpätutkimuksissa ja varsinkin elinten kasvua simuloivissa kolmiulotteisissa organoidimalleissa (7). Matrigeelin ja kaikkien eläinkudosperäisten matriksien molekyylikoostumus eroaa kuitenkin merkittävästi ihmisen kiinteän syövän mikroympäristöstä (23).

Ihmiskudosperäisiä matrikseja on käytetty harvemmin 3D-solukasvatuksissa, vaikka ne kuvastaisivat paremmin kasvainten kehittymistä ihmiskehossa. Esimerkiksi ihmisen luustolihaskudoksesta valmistetun solunulkoisen matriksin, myogeelin, on todettu olevan adipogeneettinen ja soveltuvan sarveiskalvon epiteelisolujen ex vivo -kasvatukseen, mutta sitä ei ole sovellettu syöpäsolututkimukseen (24). Muita ihmiskudosperäisiä tuotteita ovat LifeNet Healthin ihmisen vesikalvosta valmistettu HuBiogel sekä in vitro -ihmissolukasvatuksesta valmistettu matriksi, MaxGel EMC. Nämä ihmisperäiset tuotteet ovat kuitenkin peräisin terveistä kudoksista, eivät kasvainkudoksesta.

Myoomaperäistä myogeeliä valmistetaan usean eri ihmisen kohdun leiomyoomista samalla menetelmällä kuin matrigeeliä (25,26). Se on kehitetty mallintamaan ihmisen kasvaimen mikroympäristöä, ja sen käyttö on eettinen vaihtoehto koe-eläinperäisille matrikseille (26). Myogeeli sisältää samoja tyvikalvokomponentteja ja kasvutekijöitä kuin matrigeeli: laminiinia, tyypin IV kollageenia ja epidermaalista kasvutekijää, mutta toisin kuin matrigeelissä, myogeelissä on esimerkiksi tenaskiini C:tä sekä tyypin XII ja tyypin XIV kollageenia (26). Myogeelin ja matrigeelin proteiinikoostumukset eroavat toisistaan 64-prosenttisesti (26).

Hypoksinen, kiinteä myoomanappi, joka on sekin valmistettu samasta kudoksesta kuin myogeeli, mallintaa hyvin kasvainsolukon invaasiota (26,27). Myogeelin ja matrigeelin reologisia eli virtausominaisuuksia on vertailtu keskenään yksittäin sekä kollageeniin sekoitettuna (28). Matrigeeli, matrigeelikollageeni ja myogelikollageeni ovat kiinteydeltään samanlaisia.

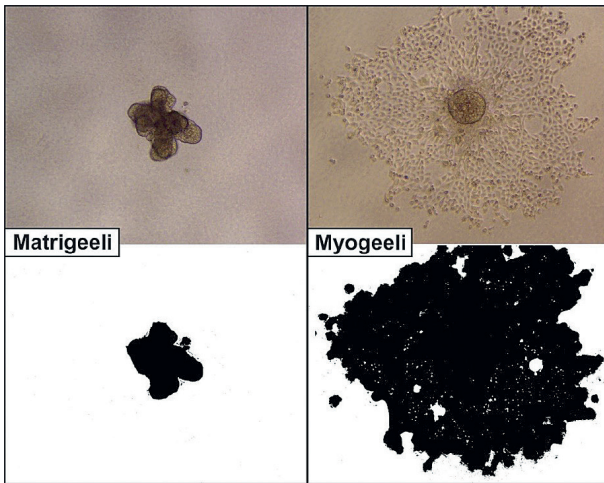


KUVA 3. Kolmiulotteisilla malleilla voidaan kasvattaa soluja ryppäinä joko pelkässä elatusaineessa tai solunulkoisen matriksin sisällä. Matriksin käyttö mahdollistaa myös syöpäsolujen invaasion tutkimisen erilaisilla menetelmillä, kuten haava-, transwell- sekä sferoidikokeella. Transwell-kokeella tutkitaan syöpäsolujen migraatiota kalvon läpi houkuttimena toimivaan seerumia sisältävään elatusaineeseen. Kalvo voidaan päällystää matriksilla, jolloin kyseessä on invaasiokoe, kun syöpäsolujen siirtyminen vaatii invaasion matriksin läpi. Haavakokeessa syöpäsolukloon luodaan haava, jonka sulkeutumista mitataan solujen migroituessa soluviljelylevyn pintaa pitkin. Myös tämä koe voidaan muuttaa invaasiokokeeksi matriksia käyttämällä.

Myogeelin, joka on matrigeliä pehmeämpää ja vähemmän viskoosista, jäykkyyttä voidaan säädellä mieleiseksi siihen sekoitettavien geelien, kuten agarosin, kollageenin tai fibriinin avulla. Esimerkiksi kollageenin lisäys myogeeliin lisää geelin jäykkyyttä ja viskositeettia (28). Myoomanappeja ja myogelia voi saada professori Tuula Salon ryhmästä yhteistyöprojekteihin tai ostaa Oulun yliopistolta. Leiomyomakudoksen käyttö on Pohjois-Pohjanmaan hyvinvointialueen alueellisen lääketieteellisen tutkimus-

eettisen toimikunnan hyväksymää (lausunto numero 2/2017).

Synteettisiä hydrogeelejä valmistetaan vesiliukoisten molekyylien polymerisaatiolla, jolloin lopputuotteena on vesipitoinen polymeeriverkko. Koivun selluloosasta valmistettu hydrogeeli, Growdex, soveltuu myös potilas-peräisten syöpäsolujen lääketestaukseen (29). Synteettisten matriksien molekyylikoostumuksessa ja rakenteessa valmistuserien väliset erot ovat vähäisiä, mutta niistä puuttuvat ihmisten



KUVA 4. Mikroskooppikuvissa kielisyöpäsoluja invasoitumassa kolmiulotteisessa sferoidimallissa kahdessa eri väliaineessa kolmen päivän jälkeen. Vasemmassa yläkuvassa väliaineena on käytetty hiiriperäistä matrigeeliä ja oikeassa yläkuvassa ihmiskasvainperäistä myogeeliä. Alemmissä kuvissa kielisyöpäsolujen invasioalue on analysoitu Ilastik-ohjelmalla. Myogeelissä kielisyöpäsolut invasoituvat nopeasti, kun taas matrigeelissä solut eivät invasoitu vaan muodostivat epäsymmetrisen rakenteen. Useimmat testatut pään ja kaulan alueen syöpäsolulinjat eivät invasoitu matrigeelissä.

kasvaimien lukuisat syövän kasvua indusoivat molekyylit (30).

3D-soluviljelymalleja suun ja nielun syöpätutkimukseen

Maljalla tapahtuva in vitro -kasvatus ja potilaassa oleva syöpäkudus eroavat merkittävästi toisistaan, ja syöpäsolut ovat 2D-soluviljelmässä usein herkempiä lääkkeille potilaan syöpäkudoksessa oleviin soluihin verrattuna (21). 3D-viljelmien on todettu jäljittelevän paremmin in vivo -kasvaimen mikroympäristöä muun muassa solujen ravinne- ja happigradientin osalta (31). Elimistössä syöpäsolujen nopea jakautuminen ja epätäydellinen verisuonitus aiheuttavat useimpiin kiinteisiin syöpiin hypoksiaa ja nekroosia (32). Kun syöpäsolukon halkaisija 3D-viljelmässä ylittää 500 µm, siihen muodostuu hypoksiaa ja nekroottisia alueita, jolloin viljelämä muistuttaa syövän in vivo -olosuhteita (31). Hypoksia muuttaa solujen aineenvaihduntaa, aktivoi angiogeneesiä sekä muita solujen selviytymismekanismeja (32). Syöpäkudoksen hypoksia lisää syövän kasvua, metastasointia, lääkeaineresistenssiä ja huonontaa sairauden ennustetta (32). Soluviljelymalleissa näiden tutkimisen tulisi olla mahdollista.

3D-viljelymalleissa solut kasvavat rypälemäisesti joko elatusnesteessä tai matriksissa, jossa muodostuu solujen ja soluväliaineen välisiä yhteisvaikutuksia (KUVA 3) (33). Tunnetuimmat 3D-soluviljelymallit ovat sferoidi- ja hanging

drop -menetelmät. Sferoidimallissa soluista muodostuu solupallo pyöreäpohjaisella levyllä, ja kun viljelyyn lisätään matriksi, solujen invaasion tutkiminen on mahdollista (23,34). Hanging drop -mallissa syöpäsolut kasvavat ylösalaisin roikkuvassa elatusaine- tai matriksipisarassa. Painovoiman vaikutuksesta solupallot kasautuvat pisaran päähän (KUVA 3) (23,26).

Haavakokeessa voidaan tutkia syöpäsolujen horisontaalista migraatiota. Solukon keskelle tehdään ”haava”, joka syöpäsolujen liikkuaessa sulkeutuu. Invaasion tutkiminen on tässäkin mahdollista, kun haavan päälle lisätään matriksikerros (35). Transwell-mallissa syöpäsolut taas migroituvat ohuen kalvon pienten reikien läpi elatusnesteeseen. Myös tässä mallissa kalvo voidaan päällystää matriksilla (KUVA 3) (23). Sandwich-mallissa syöpäsoluja – ja mahdollisesti myös CAF-soluja – kasvatetaan kahden geelimäisen matriksin välissä. Tämä menetelmä mallintaa syöpäsoluja kudoksen sisällä sekä solukon invaasiota kudokseen (36).

Myogeelin käyttö soluviljelymalleissa ja edut lääketestauksessa

Kielen levyepiteelikarsinomasoluilla tehdyissä in vitro -kokeissa myogeelin päällä tai sisällä syöpäsolut jakautuvat ja invasoituvat nopeammin kuin matrigeelissä tai kollageeni I -matriksissa (KUVA 4) (26,34,35). Myös muut kiinteät kasvaintyyppit, kuten mukoepidermoidikarsinoma, melanooma, rinta-, keuhko-, haima-

Ydinasiat

- ▶ In vitro -syöpälääketutkimusten heikko ennustavuus on merkittävä haaste uusien syöpälääkkeiden löytämisessä.
- ▶ Matriksia hyväksikäyttävät soluviljelmät mallintavat kudoksia paremmin kuin kaksulotteisella muovialustalla tehtävät soluviljelmät.
- ▶ Ihmisen kasvaimesta valmistettu myogeeli toimii hyvin solunulkoisena matriksina syöpäsolvuviljelmissä.
- ▶ Myogeeli ennustaa suun ja nielun syöpien lääkkeiden kliinistä tehoa paremmin kuin muovi tai matrigeli.

sekä paksusuolen syöpäsolut invasoivat tehokkaasti myoomapohjaisissa invaasiokokeissa (23,37). Myogeeliä on kattavasti sovellettu ja vertailtu kaupallisiin matrikseihin useissa eri 3D-tutkimusmalleissa, kuten sferoidi-, haava-, transwell- ja hanging drop -menetelmissä (**TAULUKKO**). Myogeeli on osoittautunut soveltuvan erinomaisesti kyseisiin soluviljelymalleihin, usein jopa paremmin kuin verrokkinsa. Soluille sopivan matriksin valinta onkin tärkeää, sillä matriksin koostumus vaikuttaa huomattavasti eri syöpäsolutyyppien invaasiokykyyn.

Suurikapasiteetisella seulontamenetelmällä (high-throughput screening, HTS) etsitään mahdollisia uusia syöpälääkkeitä. HTS-menetelmässä syöpäsolut kasvatetaan muovin päällä. Menetelmässä lääkeaineen vaikutusta seurataan mittaamalla solukuolemaa, solujen elinkykyisyyttä tai niiden jakautumista.

Tutkimusryhmämme testasi lääkkeiden tehoa syöpäsoluihin myös matriksien päällä ja niiden sisällä. Tutkimme HTS-menetelmällä 19 lääkeaineen (EGFR:n, MEK:n ja PI3K/mTOR:n estäjät) vastetta viidessä erilaisessa kasvatusolosuhteessa: muovialustalla, myogeelillä ja matrigeelillä päällystetyillä levyillä sekä näiden geelien sisällä. Vertasimme in vitro -tutkimuksesta saatuja lääkevasteita julkaisuista kerättyihin kliinisiin lääkevasteisiin. Tulokset osoittivat, että myogeeelin päällä kasvatettujen solujen EGFR:n estäjien vaste oli lähimpänä

kliinisissä kokeissa saatuja tuloksia. Myogeeelin käyttö prekliinisissä syöpälääketutkimuksissa voisikin olla hyödyllistä, sillä se saattaa parantaa in vitro -syöpälääketestauksen kliinistä ennustettavuutta ja vähentää väärin positiivisten lääkeaineiden pääsemistä kliinisiin kokeisiin (33).

Käytimme myogeeliä myös laajemmassa, lähes 400 lääkeainetta sisältäneessä seulonnassa, jossa sädetimme myogeeelin päällä kasvatettuja syöpäsoluja lääkeaineiden lisäyksen jälkeen. Useimmat lääkeaineista eivät muuttaneet sädetuksen vaikutuksesta solujen elinkykyisyyttä, mutta sädetys lisäsi osan lääkkeitä tehoa synergisesti. Kokeessamme Bcl-2:n ja Bcl-xL:n estäjä navitoklaksi osoittautui lupaavimmaksi lääkeainekandidaatiksi, sillä se vähensi suun ja nielun syöpäsolujen elinkykyisyyttä sekä lisäsi apoptoosia yhdessä sädehoidon kanssa (38). Navitoklaksi, jota tutkitaan kliinisissä kokeissa pienisoluisen keuhkosyövän ja hematologisten syöpien hoidossa, saattaisi soveltua myös suun ja nielun syöpäpotilaiden kliinisiin jatkotutkimuksiin (39).

Mikrofluidisen sirun käyttö immuunihoidovasteen testaamiseen

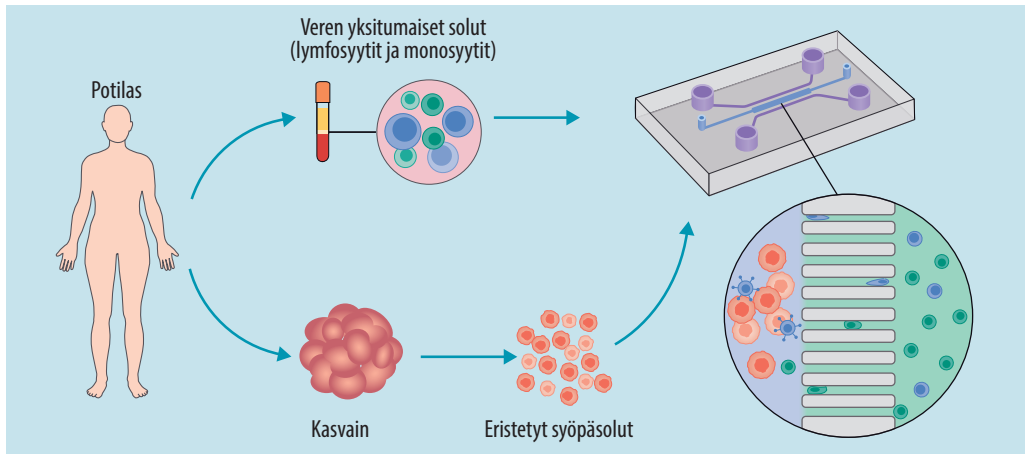
Syöpälääketutkimuksessa mikrofluidisilla siruilla tarkoitetaan 3D-soluviljelmää, jossa mikrokanavien ja nestevirtausten avulla in vitro -viljelmästä pyritään saamaan entistä tarkempaa (40). Mikrofluidisilla siruilla solopopulaatioita kasvatetaan erillisissä kammioissa elatusaineessa tai matriksissa. Kammiot ovat yhteydessä toisiinsa mikrokanavien kautta, joiden läpi elatusainetta voidaan kierrättää ja eri solopopulaatioiden liikkumista kammioiden välillä voidaan seurata.

Kehitimme mikrofluidisia siruja suun ja nielun alueen syöpäpotilaiden immuunihoidovasteen määrittämiseksi ja loimme ensimmäisen, täysin ihmiskudosperäisen mikrofluidisen sirumääritysmenetelmän (41). Sirussa syöpäsoluja kasvatetaan myogeeli-fibriinimatriksissa erillisessä kammiossa, johon immuunisolut siirtyvät pienten kanavien kautta (**KUVA 5**). Sirulla voidaan tutkia syöpäsolulinjojen lisäksi myös suoraan potilaasta eristettyjä syöpä- ja immuun-

TAULUKKO. Myogeelin käyttöä migraatio- ja invaasiokokeissa eri syöpäsolulinjoilla verrattuna kaupallisiin matrikseihin. Solulinjojen invasiivisuus matrikseissa on merkitty asteikolla – (ei invasiivinen) – +++ (erittäin invasiivinen) (23,26,35).

Migraatiokokeet						
Haavakoe						
Solulinja	Kudostyyppi	Myogeeli	Matrigeeli			Viite
HSC-3	Kielisyöpä	+++ / +++	+ / +++			(26)/(23)
MDA-MB-231	Rintasyöpä	+++				(23)
Pa01c	Haimasyöpä	++	++			(23)
Pa02c	Haimasyöpä	+++	+++			(23)
Pa03c	Haimasyöpä	+++	++			(23)
Pa04c	Haimasyöpä	–	–			(23)
Invaasiokokeet						
Haavakoe						
Solulinja	Kudostyyppi	Myogeeli	Matrigeeli	Kollageeni	Fibriini	Viite
HSC-3	Kielisyöpä	+++ (KOL)	–			(23)
UT-SCC-24A	Kielisyöpä	+++ (KOL) / – (FIB)	–	++	–	(35)
UT-SCC-24B	Kaulan imusolmuke	+++ (KOL) / – (FIB)	–	++	–	(35)
UT-SCC-42A	Kurkunpäänsyöpä	+++ (KOL) / – (FIB)	–	+	–	(34,35)
UT-SCC-42B	Kaulan imusolmuke	+++ (KOL) / – (FIB)	–	+	–	(34,35)
MDA-MB-231	Rintasyöpä	++ (KOL)	+++			(23)
Pa01c	Haimasyöpä	+ (KOL)	–			(23)
Pa02c	Haimasyöpä	+ (KOL)	–			(23)
Pa03c	Haimasyöpä	++ (KOL)	–			(23)
Pa04c	Haimasyöpä	– (KOL)	–			(23)
Sferoidikoe						
Solulinja	Kudostyyppi	Myogeeli	Matrigeeli	Kollageeni	Fibriini	Viite
UT-SCC-24A	Kielisyöpä	+ (KOL) / +++ (FIB)	–	–	–	(35)
UT-SCC-24B	Kaulan imusolmuke	+++ (KOL) / ++ (FIB)	–	–	–	(35)
UT-SCC-42A	Kurkunpäänsyöpä	+ (KOL) / +++ (FIB)	–	–	+	(35)
UT-SCC-42B	Kaulan imusolmuke	++ (KOL) / +++ (FIB)	–	–	+	(35)
Transwell-koe						
Solulinja	Kudostyyppi	Myogeeli	Matrigeeli	Agaroosi		Viite
HSC-3	Kielisyöpä	++	+			(26)
SCC-9	Kielisyöpä	++ (AGA)	+ (GFR)	–		(26)
LN-1	Suusyöpä	++ (AGA)	+ (GFR)	–		(26)
LN-2	Suusyöpä	++ (AGA)	+ (GFR)	–		(26)
SK-Mel	Melanooma	++ (AGA)	+ (GFR)	–		(26)
S2058	Melanooma	++ (AGA)	+ (GFR)	–		(26)
Hanging drop-koe						
Solulinja	Kudostyyppi	Myogeeli	Matrigeeli	Kollageeni		Viite
HSC-3	Kielisyöpä	+++ (COL)	+ (COL)	++		(26)

AGA = agaroosi, FIB = fibriini, GFR = vähennetyt kasvutekijät (growth factor reduced), KOL = kollageeni



KUVA 5. Mikrofluidista sirumääritystä voidaan käyttää suu- ja nielusyöpäpotilaan yksilöllisen immuunihoidolääkivasteen määrittämisessä. Mikrofluidinen siru sisältää erillisiä kammioita, joihin voidaan lisätä potilaasta eristettyjä immuunisoluja ja syöpäsoluja. Syöpäsolut kasvavat sirussa myogeeli-fibriinimatriksin sisällä. Kammiot ovat yhteydessä toisiinsa mikroskooppisilla kanavilla. Mikrofluidisella sirulla voidaan havainnoida immuunisolujen liikkumista kanavien kautta syöpäsolujen alueelle, solujen määrää ja solukuoleman määrää.

nisoluja (41). Potilaiden syöpäsolut eristetään kollageenaasientsyymillä kevyesti hajotetuista kudospaloista ja immuunisolut potilaan verestä. Tutkimme sirulla immunologisten lääkkeiden ja immuunivasteen muuntajien vaikutuksia immuunisolujen siirtymiseen syöpäsoluja kohti sekä syöpäsolujen jakautumista ja apoptoosia (41,42). Analysoimme eri lymfositityypien vastetta immuunihoidon sekä solujen sytokiinien tuotantoa (42,43). Olemme myös tutkineet potilaan kasvain- ja immuunisolujen vastetta immuunihoidon ja ennustavuutta potilaan hoitovasteeseen (43). Osoitimme sirukokeen tuloksen olevan yhtenevä potilaan negatiivisen hoitovasteen kanssa (43). Lisää tutkimuksia kuitenkin tarvitaan, jotta määrittäystä voitaisiin tulevaisuudessa käyttää apuna potilaan immuunihoidovasteen ennustamisessa.

Lopuksi

Eläinkokeet ennustavat huonosti ihmisen syöpälääkevastetta. Jatkossa niiden määrää tulee EU:ssa vähentää, eikä uusilta lääkaineilta enää vaadita eläinkokeita ennen klinisiä kokeita. Syöpälääketutkimuksen haasteena on kuitenkin löytää in vitro -olosuhteet, jotka mallintaisivat syövän monimuotoista mikroympäristöä erilaisine solupopulaatioineen ja tuottaisivat luotettavia tuloksia. Ihmiskasvainperäinen myogeeli

on osoittautunut lupaavaksi solunulkoisen matriksin mallintajaksi syöpälääketutkimuksissa. Olemme yhteistyönä kehittäneet matrikseja myös suusyöpäpotilaiden kaulan imusolmukkeista (44), munasarjakarsinoomapotilaiden vatsakalvosta (45) ja haimasyöpäpotilaiden haimasta. Nämä uudet ihmisperäiset matriksit voisivat tarjota kasvualustan myös muiden syöpien in vitro -kudosrelevanteille syöpälääkekeille. ■

JOONAS MATIKAINEN, HLK

Suu- ja leukasairauksien osasto, lääketieteellinen tiedekunta, Cliniicum, Helsingin yliopisto

KATJA KORELIN, FT

Suu- ja leukasairauksien osasto, Cliniicum, Translational immunology program (TRIMM), lääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto

TUULA SALO, suupatologian professori, HLT, EHL

Suu- ja leukasairauksien osasto, Cliniicum, Translational immunology program (TRIMM), lääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto
HUS, diagnostiikka, patologian laitos
Väestöterveyden tutkimusyksikkö, Oulun yliopisto ja Medical Research Center Oulu (MRC Oulu), Pohjois-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri ja Oulun yliopisto

VASTUUTOIMITTAJA

Tuomas Mirtti

SIDONNAISUUDET

Joonas Matikainen: Ei sidonnaisuuksia

Katja Korelin: Ei sidonnaisuuksia

Tuula Salo: Luentopalkkio/asiantuntijapalkkio (SHS Apollonia; STAL, Plandent), luottamustoimet (Duodecim, Suusyövän Käypä hoito -työryhmän puheenjohtaja; SHS Apollonia, suupatologian ja suulääketieteen jaosto), muut sidonnaisuudet (Coronaria; Mehiläinen)

KIRJALLISUUTTA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
2. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2014;26:123–41.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67:7–30.
4. Drugs approved for head and neck cancer. Bethesda: National Cancer Institute 2021. <https://cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/head-neck>.
5. Maeda H, Khatami M. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs. *Clin Transl Med* 2018;7:11.
6. Wadman M. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science* 2023;379:127–18.
7. Munne P, Savelius M, Juopperi I, et al. Kuinka pitää syöpä hengissä? *Duodecim* 2018;134:784–92.
8. Butturini E, de Prati AC, Boriero D, et al. Tumor dormancy and interplay with hypoxic tumor microenvironment. *Int J Mol Sci* 2019;20:4305.
9. Li S, Pritchard DM, Yu LG. Regulation and function of matrix metalloproteinase-13 in cancer progression and metastasis. *Cancers* 2022;14:3263.
10. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16:582–98.
11. Pires A, Burnell S, Gallimore A. Exploiting ECM remodelling to promote immune-mediated tumour destruction. *Curr Opin Immunol* 2022;74:32–8.
12. Menyhárt O, Harami-Papp H, Sukumar S, et al. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. *Biochim Biophys Acta* 2016;1866:300–19.
13. Gorchs L, Kaipe H. Interactions between cancer-associated fibroblasts and T cells in the pancreatic tumor microenvironment and the role of chemokines. *Cancers* 2021;13:2995.
14. Dourado MR, Korvala J, Åström P, et al. Extracellular vesicles derived from cancer-associated fibroblasts induce the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Extracell Vesicles* 2019;8:1578525.
15. Ahmadi M, Rezaie J. Tumor cells derived-exosomes as angiogenic agents: possible therapeutic implications. *J Transl Med* 2020;18:249.
16. Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res* 2019;79:4557–67.
17. AmeliMojarad M, AmeliMojarad M, Cui X. Prospective role of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in GI cancer. *Pathol Res Pract* 2023;244:154338.
18. Ansari MJ, Bokov D, Markov A, et al. Cancer combination therapies by angiogenesis inhibitors; a comprehensive review. *Cell Commun Signal* 2022;20:49.
19. Hujanen R, Almahmoudi R, Karinen S, et al. Vasculogenic mimicry: a promising prognosticator in head and neck squamous cell carcinoma and esophageal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Cells* 2020;9:507.
20. da Dolens ES, de Moraes EF, Paranaíba LMR, et al. Prognostic significance of the neural invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2023;52:476–82.
21. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci* 2018;14:910.
22. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 2005;15:378–86.
23. Salo T, Dourado MR, Sundquist E, et al. Organotypic three-dimensional assays based on human leiomyoma-derived matrices. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018;373:20160482.
24. Abberton KM, Bortolotto SK, Woods AA, et al. Myogel, a novel, basement membrane-rich, extracellular matrix derived from skeletal muscle, is highly adipogenic in vivo and in vitro. *Cells Tissues Organs* 2008;188:347–58.
25. Kibbey MC. Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *J Tissue Cult Methods* 1994;16:227–30.
26. Salo T, Sutinen M, Hoque Apu E, et al. A novel human leiomyoma tissue derived matrix for cell culture studies. *BMC Cancer* 2015;15:1.
27. Åström P, Heljasvaara R, Nyberg P, et al. Human tumor tissue-based 3D in vitro invasion assays. *Methods Mol Biol* 2018;1731:213–21.
28. Hoque Apu E, Akram SU, Rissanen J, et al. Desmoglein 3 – influence on oral carcinoma cell migration and invasion. *Exp Cell Res* 2018;370:353–64.
29. Feodoroff M, Mikkonen P, Turunen L, et al. Comparison of two supporting matrices for patient-derived cancer cells in 3D drug sensitivity and resistance testing assay (3D-DSRT). *SLAS Discovery* 2023;28:138–48.
30. Cruz-Acuña R, García AJ. Synthetic hydrogels mimicking basement membrane matrices to promote cell-matrix interactions. *Matrix Biol* 2017;57–58:324.
31. Vinci M, Gowan S, Boxall F, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* 2012;10:1–21.
32. Jing X, Yang F, Shao C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Cancer* 2019;18:1–15.
33. Tuomainen K, Al-Samadi A, Potdar S, et al. Human tumor-derived matrix improves the predictability of head and neck cancer drug testing. *Cancers* 2019;12:92.
34. Naacka E, Tuomainen K, Wistrand H, et al. Fully human tumor-based matrix in three-dimensional spheroid invasion assay. *JoVE* 2019;2019:e59567.
35. Wahbi W, Naacka E, Tuomainen K, et al. The critical effects of matrices on cultured carcinoma cells: human tumor-derived matrix promotes cell invasive properties. *Exp Cell Res* 2020;389:111885.
36. Hoque Apu E. Migration and invasion pattern analysis of oral cancer cells in vitro. Väitöskirja. Oulu: Oulun Yliopisto 2018.
37. Naacka E, Barros-Filho MC, Adnan-Awad S, et al. miR-22 and miR-205 drive tumor aggressiveness of mucoepidermoid carcinomas of salivary glands. *Front Oncol* 2022;11:786150.
38. Tuomainen K, Hyttiäinen A, Al-Samadi A, et al. High-throughput compound screening identifies navitoclax combined with irradiation as a candidate therapy for HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* 2021;11:1–10.
39. Perini GF, Ribeiro GN, Pinto Neto JV, et al. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2018;11:1–15.
40. Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer* 2019;19:65–81.
41. Al-Samadi A, Poor B, Tuomainen K, et al. In vitro humanized 3D microfluidic chip for testing personalized immunotherapeutics for head and neck cancer patients. *Exp Cell Res* 2019;383:111508.
42. Sieviläinen M, Saavalainen J, Adnan-Awad S, et al. IDO1 inhibition reduces immune cell exclusion through inducing cell migration while PD-1 blockage increases IL-6 and -8 secretion from T cells in head and neck cancer. *Front Immunol* 2022;13:812822.
43. Wahbi W, Korelin K, Sieviläinen M, et al. Evaluation of in vitro and in vivo personalized cancer treatment assays for oral squamous cell carcinoma. *Transl Oncol* 2023;33:101677.
44. Naacka E, Wahbi W, Tiikkaja R, et al. Novel human lymph node-derived matrix supports the adhesion of metastatic oral carcinoma cells. *BMC Cancer* 2023;23:1–12.
45. Neilson LJ, Cartwright D, Risteli M, et al. Omentum-derived matrix enables the study of metastatic ovarian cancer and stromal cell functions in a physiologically relevant environment. *Matrix Biology Plus* 2023;19–20:100136.