



Kandidaatintutkielma

Mikrofluidiset mallit metastaasitutkimuksessa

Joonatan Hiltunen

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

Sisällys

1. Johdanto	1
2. Mikrofluidisten mallien valmistaminen ja materiaalit	2
2.1. Mikrosirujen valmistusmateriaalit.....	2
2.2. Mikrosirun valmistusmenetelmiä	3
2.3. Kasvaimen mikroympäristön mallintaminen	5
2.4. Verenkierron mallintaminen mikrofluidisissa syöpämalleissa.....	7
3. Mikrofluidisten mallien käyttötarkoituksia metastaasitutkimuksessa.....	7
3.1. Syövän diagnosointi mikrofluidisilla malleilla	7
3.1.1. CTC:iden havaitseminen ja erottelu	8
3.1.2. Rintasyövän tunkeutumispotentiaalin markkerien tutkiminen.....	9
3.1.3. Syövän ekstravasaatiopotentiaalin tutkiminen	10
3.2. Syövän hoitamisen tutkiminen mikrofluidisilla malleilla	12
3.2.1. Immuno-onkologian menetelmiä	13
3.2.2. Kemoterapia	14
3.2.3. Desitabiinin vaikutuksen tutkiminen sytokiinihoidon tehokkuuteen	15
3.2.4. Korkean läpisyötön mikrofluidiset mallit potilaskohtaiselle syöpähoitokäytännölle	17
3.3. Syövän ominaisuuksien tutkiminen mikrofluidisilla malleilla.....	18
4. Mikrofluidisten mallien tulevaisuus metastaasitutkimuksessa	20
Kirjallisuusviitteet	21

Käytetyt lyhenteet

ACT	Adoptive cell transfer therapy
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster of differentiation
COC	Cyclic olefin copolymer
CPT	Camptothecin
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
CT	Cancer/Testis
CTC	Circulating tumor cell
DAC	desitabiini
DCIS	Ductal carcinoma <i>in situ</i>
dECM	decellularized extra cellular matrix
DOX	Doxorubicin
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-to-mesenchymal
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ER	estrogenireseptori
GelMA	Gelatin methacryloyl
hBM-MSC-s	human bone marrow-derived mesenchymal stem cells
HER2	Human epidermal growth receptor 2
HIF	Hypoxia induced factor
HIF-1 α	Hypoxia induced factor 1 α
ICI	Immune checkpoint inhibitor
IDC	Invasive ductal carcinoma
IFN- α	interferoni alfa
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matrix metalloproteinase
NK	Natural killer
OD	Osteo-differentiated
PC	Poly carbonate
PCL	Polycaprolactone
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PDMS	Polydimethylsiloxane

PEDGA	Poly (ethylene Glycol Diacrylate)
PMMA	Poly (methyl methacrylate)
PR	progesterone receptor
TNBC	Triple negative breast cancer
TRPM7	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member

1. Johdanto

Syöpä on tauti, jossa solut jakautuvat hallitsemattomasti muodostaen pahanlaatuisen kasvaimen. Kasvaessaan syövän hallitsematon jakautuminen on itsenäistä ja rajatonta. Laajentuva syöpäkasvain vaatii jatkuvasti lisääntyvää määrää verta, joten uutta verisuonistoa rakennetaan. Tämän lisäksi syöpä välttää jakautumista rajoittavia signaaleja sekä apoptoosia (Mahhengam *et al.* 2021).

Syövän kasvaessa sen hapen, tilan ja metaboliittien tarve kohoaa. Tämä korostuu varsinkin syövän tunkeutuessa kudokseen primäärikasvaimen ympärillä. Nämä puutokset on yhdistetty aiheuttavan syövän morfologisia muutoksia epiteeli - mesenkymaalisen muunnoksen (Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) kautta. Tätä reittiä muuntuminen aiheuttaa syöpäsoluissa huomattavaa motiliteetin kasvua (Frankman *et al.* 2022).

Etäpesäke eli metastaasi syntyy, kun syövästä irtoavat solut intravasoituvat eli tunkeutuvat veri- tai imusuonistoon. Toisen kudoksen lähelle kulkeutuvat syöpäsolut ekstravasoituvat, eli tunkeutuvat ulos suonistosta kudokseen muodostaen sinne sekundaarisen kasvaimen. Lähes joka kuudes kuolema globaalisti johtuu syövästä. Metastaasit aiheuttavat näistä kuolemista suurimman osan (Sleeboom 2020).

Metastaattinen syöpä on vaikeahoitoinen. Mutaatiot ja monimutkainen kasvuympäristö aiheuttavat suuren haasteen metastaasien mallinnuksessa. Eläinmallit antavat keinon tutkia syövän käyttäytymistä monimutkaisessa kasvuympäristössä, mutta poikkeavat ihmisen fysiologiasta immuunipuolustuksen ja metastaasin leviämiskäyttäytymisen kohdalla (Graney *et al.* 2021).

Mikrofluidiset mallit ovat mikrokanavia sisältäviä malleja. Kanavien läpi kulkeutuu joko laminaarisen virtauksen tai pumppauksen keinoin nestettä. Mikrofluidisten mallien tarkoitus tutkimuksessa on usein testata tiettyjen solujen ja kudoksien reaktioita olosuhteisiin tai aineisiin. Malleja on monia eri tyyppisiä, jotka tutkivat biokemiallisia reaktioita eri näkökulmista. Mallien monimuotoisuus mahdollistaa eri syöpien, syövän olosuhteiden, metastaasien kohde-elimien sekä lukuisten muiden osa-alueiden tutkimisen (Graney *et al.* 2021).

Viimeisen vuosikymmenen aikana mikrofluidiset mallit ovat tuottaneet lupaavia tuloksia syövän fysiologian mallinnuksessa. Täysin tarkan syöpämallin tuottaminen on kuitenkin monimutkainen prosessi. Monet mallit keskittyvät tiettyyn syövän osa-alueeseen ja jättävät huomioimatta esimerkiksi endokriini- ja parakriinivuorovaikutukset, jotka vaikuttavat syövän toimintaan. Myös immuunisolujen vaikutus syöpämalleissa on usein aliarvioitu. Korjaamalla nykyisiä puutoksia malleissa on kuitenkin mahdollista tuottaa ennustuksia metastaasikäyttäytymisestä sekä mahdollisista hoitovaihtoehdoista (Graney *et al.* 2021).

2. Mikrofluidisten mallien valmistaminen ja materiaalit

2.1. Mikrosirujen valmistusmateriaalit

Valittaessa rakennusmateriaaleja mikrofluidiseen laitteeseen tulee ottaa monta asiaa huomioon. Materiaalin hinta, bioyhteensopivuus, joustavuus, kestävyys, reagoimattomuus tutkittavan aineen kanssa, eristävyys ja matala toksisuus ovat kriteerejä, jotka täytyy ottaa huomioon etsiessä luotettavaa tulosta (Monjezi *et al.* 2021).

Alkuvaiheissa mikrofluidisten mallien historiaa lasi ja silikoni olivat yleisimmät materiaalit, joita käytettiin valmistuksessa. Kuitenkin lasi on kova ja kankea rakennusaine ja silikoni kärsii kalliista hinnasta. Nykyaikana yleisesti käytettyjä materiaaleja on monia. Polymeeri- ja paperityyppiset laitteet ovat molemmat hyvin tutkittuja. (Mahhengam *et al.* 2021, Monjezi *et al.* 2021)

Paperityyppisten laitteiden toimintaperiaatteena toimii huokoinen hydrofiilinen materiaali, kuten selluloosa tai bakteeritaalinen selluloosa, jotka liikuttavat nestettä kapillaarivoimien avulla. Kapillaarivoimien käyttäminen toimii sekä paperimallien etuna että haittana. Ne mahdollistavat mallien riippumattomuuden monimutkaisiin pumppumekanismeihin ja muihin kalliisiin lisäosiin. Tämä tekee paperityyppisistä malleista halpoja verrattuna vaihtoehtoihin ja mahdollistaa paperimallien helpon siirtämisen. Kuitenkin pumppumekanismin puuttuminen vaikeuttaa jatkuvaa viljelyaineen kuljettamista laitteen sisälle (Monjezi *et al.* 2021).

Polymeerityyppiset laitteet ovat useimmiten valmistettu polydimetyylisiloksaanista (PDMS), mutta myös muita polymeerejä, kuten polymetyylimetakrylaattia (PMMA), syklisiä

olefiinikopolymeeriä (Cyclic olefin copolymer, COC) ja polykarbonaattia (polycarbonate, PC) käytetään. Polymeerityyppisillä laitteilla on monia etuja. Yleisimmin käytetty materiaali PDMS on läpinäkyvä, bioyhteensopiva, suhteellisen halpa, inertti, joustava sekä kestävä. Kestävyytensä takia PDMS:ään voi kiinnittää pumppuja sekä lisäosia. Tämä sallii jatkuvan viljelyaineen virtauksen laitteen läpi. PDMS:n vahvuuksien takia se on yleisimmin käytetty rakennusmateriaali mikrofluidisessa syöpätutkimuksessa. PDMS:n heikkoudeksi on kuitenkin ilmennyt sen taipumus imeä hydrofobisia yhdisteitä, kuten lääkkeitä ja proteiineja. Tämä voi aiheuttaa epätarkkuuksia tutkimustuloksissa. (Liu et al. 2021, Mahhengam et al. 2021)

PMMA:n etuna PDMS:ään verrattuna mikrofluidisen mallin rakennusmateriaalina on sen matala hydrofobisuus. PMMA on myös termoplasti, minkä ansiosta se on myös halvempi valmistusmateriaali. PMMA:lla on samoja vahvuuksia kuin PDMS:llä. Se on läpinäkyvä ja kestävä. Kuitenkin PMMA osoittautuu heikommaksi vaihtoehdoksi PDMS:stä sen jäykkyydessä ja muovauksen tarkkuudessa (Liu *et al.* 2021).

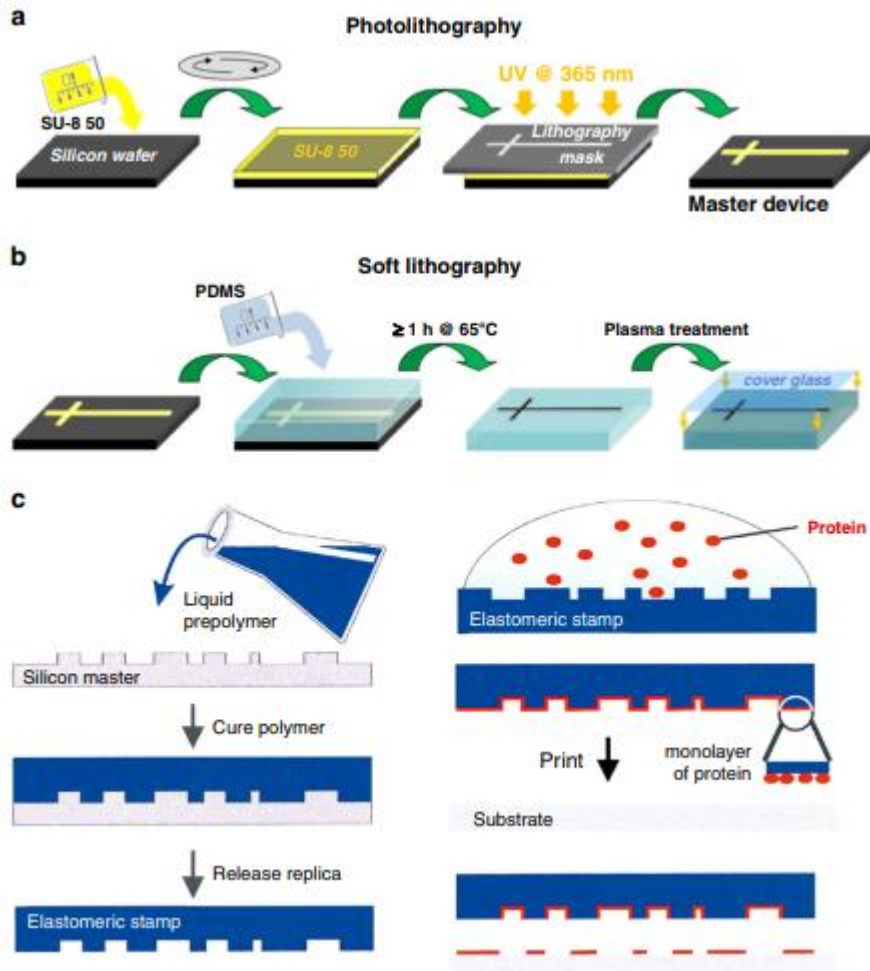
Yhtä oikeaa ratkaisua polymeerin valinnassa ei tällä hetkellä ole. Vaihtelevien ominaisuuksien takia ideaali rakennusmateriaali saattaa olla eri riippuen käyttötarkoituksesta. Esimerkiksi COC:ta käytetään yleisesti röntgenkristallografiassa (Mahhengam, 2021).

2.2. Mikrosirun valmistusmenetelmiä

Optinen litografia on menetelmä, jolla on valmistettu vuosikausia elektroniikkaa. Optisen litografian toimintaperiaate koostuu muutamasta vaiheesta. Kiekkoo, joka on valmistettu esimerkiksi silikonista, desinfioidaan ja kuivataan. Valoresististä muodostetaan pinnoite kiekon päälle pyörittämällä. Käyttäen valokuvamaskia voidaan valoresisti altistaa tietyn muotoiselle UV-säteilyn muodostamalle kuviolle. Alueet, jotka eivät reagoi UV-säteilyn kanssa voidaan sittemmin poistaa kiekosta jättäen jäljelle vain muotit. Optinen litografia on yleisesti käytetty menetelmä valmistaa haluttuja muotteja pehmeää litografiaa varten (Mahhengam, 2021). (Kuva 1.)

Pehmeä litografia sisältää menetelmät, joissa pehmeää ainetta käytetään tuotteen valmistamiseen. Aine voi olla esimerkiksi polymeeri tai geeli. Optinen litografia toimii käsi kädessä pehmeän litografian kanssa tuottamalla muotin esimerkiksi nestemäiselle polymeerille. Yleisimmin käytetty polymeeri PDMS voidaan valuttaa muottiin ja jäykistää. Näin halutut

mikrorakenteet voidaan kopioida PDMS:n pinnalle. Jäykistetty PDMS levy voi toimia leimasimena. Tällä leimasimella voidaan siirtää mikrokanavien rakenteet toiseen substraattiin. PDMS-leimasimen pinnalle voidaan myös asettaa biomolekyylejä tiettyyn kuvioon, joka kopioidaan suoraan substraatin pinnalle (Liu *et al.* 2021). (Kuva 1.)



Kuva 1. Mikrovalmistustekniikoita kasvainsirua varten.

a,b Optisen litografian ja pehmeän litografian käyttö yksinkertaisen PDMS mikrofluidisen kulttuurilaitteen valmistuksessa. Laite kiinnitetään muodossansa litteään lasisubstraattiin. c Mikrokontaktipainamisen käyttö proteiinikuvion muodostuksessa solukulttuuria varten. (Liu *et al.* 2021)

Optisen litografian ja pehmeän litografian kautta tuotetut mikrofluidiset laitteet sisältävät hienoja yksityiskohtia. Kuitenkin menetelmien heikkoudeksi osoittautuu korkea hinta ja hitaus. Nämä menetelmät ovat myös pelkästään itse mikrosirun valmistamista varten. Muut pakolliset osat syövän tutkimista varten täytyy valmistella erikseen (Liu *et al.* 2021).

Viime aikoina paljon kehittynyt biotulostamisteknologia on myös vaihtoehto mikrofluidisten laitteiden valmistuksessa. Soluja ja solujen ympäröivää ainetta voidaan tulostaa kerroksittain muodostaen lopulta monimutkaisia rakenteita. Biotulostamisen korkean tarkkuuden takia sitä voidaan käyttää kasvaimien yksityiskohtaisen heterogeenisen mikroympäristön mallintamisessa sekä mikroympäristöissä toimivien proteiinien ja kasvutekijöiden toiminnan mallintamisessa. Monia erilaisia soluja, kuten fibroblasteja, immuunisoluja ja endoteelisoluja voidaan käyttää biomusteen valmistamisessa mahdollistaen verisuoniston tulostamisen. Kasvaimille ominaiset verenkierron poikkeavuudet ovat vaikeita mallintaa perinteisillä mikrofluidisilla malleilla. Biotulostaminen on keino tutkia näitä poikkeavia verisuonia ja niiden vaikutuksia syövän toiminnassa (Liu *et al.* 2021).

2.3. Kasvaimen mikroympäristön mallintaminen

Kasvaimen mikroympäristö koostuu soluväliaineesta, syöpäsoluista, immuunisoluista sekä yhdistävistä kudoksista, kuten verisuonisto ja fibroblastit. Kasvaimen mikroympäristön on todettu vaikuttavan syövän etenemiseen huomattavasti. Kasvain pystyy vapauttamaan sytokiinejä sekä kemokiinejä, jotka aiheuttavat mikroympäristössä olevien solujen vaikutusten muuttuvan syövälle hyödylliseksi. Solut auttavat rakentamaan kasvaimen mikroympäristöä sekä suojaavat kasvainta immuunipuolustukselta. Tämän lisäksi mikroympäristö vaikuttaa syövän etenemiseen vaikuttaviin ominaisuuksiin, kuten happamuuteen ja hypoksiaan. Syövän eteneminen on pystytty yhdistämään kasvaimen mikroympäristön ominaisuuksiin, kuten jäykkyyteen. Tämän takia kasvaimen mikroympäristön mallintaminen syöpää tutkiessa on oleellista (Samadian *et al.* 2021).

Syöpää mallintaessa yleinen tapa on rakentaa kolmiulotteinen kasvainmalli laitteeseen, joka sisältää kasvaimen mikroympäristölle luontaisia soluja, kuten syöpää avustavia fibroblasteja, endoteelisoluja, perisyyttejä sekä immuunisoluja. Tämä kasvainmalli sidotaan paikalleen soluväliaineella. Mahdollisia vaihtoehtoja malleissa käytettäville soluväliaineille on monia (Samadian *et al.* 2021).

Yleensä soluväliainetta mallinnetaan tietyllä sekoituksella kehosta löytyvän soluväliaineen proteiineja, glykoproteiineja, proteoglykaaneja ja polysakkarideja. Näistä esimerkkejä ovat fibrinogeeni, fibronektiini, fibrini ja kollageeni. Näitä aineita voidaan kerätä soluista sekä kudoksesta. Matrigel on yleisesti käytetty esimerkki soluväliaineen korvikkeesta, joka kerätään

kudoksesta. Matrigeliä voidaan käyttää tyvikalvon mallintamisessa malleissa sen korkean laminiini ja kollageeni IV pitoisuuden takia. Kuitenkin Matrigel, joka on eristetty hiiren syöpäsoluista, sisältää vaihtelua, joka saattaa vaikuttaa tulosten tarkkuuteen sekä toistettavuuteen. Kuitenkin Matrigelin kaltaiset luontaiset hydrogeelit ovat yleisimmin käytettyjä mikrofluidisien mallien valmistamisessa. (Rodrigues et al. 2022, Samadian et al. 2021)

Desellularisoitu soluväliaine (Decellularized extra cellular matrix, dECM) on soluväliainekorvike, josta on poistettu ominaisuudet, jotka aiheuttavat alkuperäisen kudoksen rakenteen ylläpitämisen. Tämä voidaan saavuttaa kemiallisella käsittelyllä tai fyysisesti rikkomalla soluja. dECM voi mahdollistaa tarkemman soluväliaineen vastineen rakentamisen mikrofluidiseen malliin. Kuitenkin dECM:n valmistusprosessin aiheuttamaa vahinkoa soluväliaineeseen on vaikea välttää (Rodrigues et al. 2022).

Myös synteettisiä materiaaleja on käytetty tyvikalvon mallintamisessa sekä luodessa huokoisia kasvualustoja. Synteettisillä materiaaleilla etuna on korkea kestävyys ja ne pitävät halutun muodon. Esimerkiksi aineita, kuten polyetyleeniglykolidiakrylaattia (PEGDA) ja poly(hexano-6-laktonia) (PCL) on käytetty näissä tarkoituksissa. (McGovern et al. 2021, Zhu et al. 2021)

Mallintaessa kasvaimen mikroympäristöä tulee ottaa myös huomioon monet gradientit, joita esiintyy syövässä. Happigradietti syövässä syntyy solujen hallitsemattoman jakautumisen seurauksena. Hapen imeytyminen ei välttämättä yllä kauimpiin syöpäsoluihin. Vaikka syöpä pystyy varsinkin hypoksisissa olosuhteissa tuottamaan verisuonistoa edistämään hapen ja ravinteiden kuljetusta, on syövän tuottaman verisuoniston laatu vaihtelevaa. Syövän tuottama verisuonisto on usein epäorganoitua ja haurasta. Tämän takia kasvaimen happitaso vaihtelee 0,01 % ja 4,2 % välillä, kun taas normaalissa kudoksessa happitaso on tasainen noin 5 % paikkeilla. Syöpäsolujen on huomattu useaan otteeseen liikkuvan korkeamman happipitoisuuden suuntaan ja hypoksian on todettu aiheuttavan EMT-reitin aktivoitumista. Hypoksian on myös osoitettu vaikuttavan soluvälitilan rakenteen vahvuuteen. Soluvälitilan sekä tyvikalvon rakenteen vahvuus ovat oleellisia asioita metastaasien syntymisen rajoittamisessa (Ahmed & Nagelkerke, 2021).

Hypoksian indusoima tekijä (HIF) on yksi tunnetuimmista reiteistä, miten hypoksia vaikuttaa soluihin. HIF:n isomeeri HIF-1 α :n on osoitettu aiheuttavan syövän kehittymistä sekä

metastoitumista. HIF-1 α muun muassa edistää DNA:n korjausta syöpäsoluissa sekä rajoittaa p53-geenin ilmentämistä. p53-geenin ilmentämisen rajoittaminen vähentää apoptoosin määrää soluissa. Tämä heikentää myös p53-apoptoosireittiä hyväkseen käyttävien kemoterapioiden vaikutusta syövän hoitamisessa (Ahmed & Nagelkerke, 2021).

2.4. Verenkierron mallintaminen mikrofluidisissa syöpämalleissa

Mikrofluidisen mallin etuna toimii sen kyky mallintaa verenkiertoa. Yleensä verenkiertoa mallintaessa tavoitteena on saada tarkka malli ihmisen verenkierrosta. Tämä mahdollistaa kliinisesti relevantimmat tulokset esimerkiksi intravasaatiota tutkiessa. Kolme tärkeää seikkaa, jotka täytyy ottaa huomioon verenkiertoa mallintaessa, ovat nesteen virtaustahti ja sen aiheuttama leikkausjännitys sekä verisuoniston permeabiliteetti eli sen läpäistävyys.

Syövän intravasaatio tapahtuu helpommin matalassa leikkausjännityksessä. Transienti reseptoripotentiaaliekationikanava, alaheimo M, alkio 7 (Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 7, TRPM7) on reseptoriproteiini, joka aiheuttaa solun ulkopuolisen kalsiumin imeytymistä aktivoiden RhoA/myosiini-II ja kalmoduliini/IQGAP1/Cdc42 -reittejä. Tämä johtaa solun migraation suunnan vaihtumiseen korkean leikkausjännityksen ilmetessä polarisaatiomuutoksen seurauksena (Yankaskas et al. 2021).

3. Mikrofluidisten mallien käyttötarkoituksia metastaasitutkimuksessa

Mikrofluidisilla malleilla on useita eri käyttötarkoituksia syövän ja metastaasien tutkimisessa. Syövän diagnosointi, syövän hoitaminen erilaisilla keinoilla sekä syövän ja metastaasien ominaisuuksien tutkiminen vaativat rakenteeltaan erilaisia malleja.

3.1. Syövän diagnosointi mikrofluidisilla malleilla

Syöpä erittää vereen erilaisia proteiineja, kasvuhormoneja, syöpään liittyviä nukleinihappoja sekä eksosomeja, jotka toimivat esimetastaattisen lokeron valmistamisessa. Näiden lisäksi metastaasin syntymistä varten syöpä voi erittää verenkiertoon tai imusuonistoon kiertäviä syöpäsoluja (Circulating tumor cell, CTC). CTC:iden ja kasvaimen pahalaatuisuuden

markkereiden havaitsemista varten on valmistettu monia mikrofluidisia malleja. Ideaalitulanteessa syöpä voidaan diagnosoida potilaalle pelkällä verinäytteellä. Kuitenkin kasvaimen pahalaatuisuuden ja kehityksen vaiheen arvioimista varten voidaan käyttää myös muita keinoja, kuten tunkeutuvalle syöväälle biomarkkereina toimivien reseptorien ilmenemisen tarkastelua (Mahhengam *et al.* 2021).

3.1.1. CTC:iden havaitseminen ja erottelu

Ensimmäinen CTC:iden erotteluun käytetty mikrofluidinen laite käytti hyväkseen vasta-aineita. Vasta-aineet laitteessa tarttuivat epiteelisolukiinnitysmolekyyliin (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM). Anti-EpCAM-vasta-aineen käyttö perustui EpCAM:n yleiseen ilmenemiseen CTC:issä sekä sen puuttumiseen verisoluissa. Myös muita aineita, kuten kasvutekijöiden reseptoreja on käytetty vasta-aineiden kohteina. Kuitenkin monet syöpäsolut eivät ilmennä näitä molekyyliä. Näiden biokemiallisten markkereiden lisäksi CTC:itä ollaan eroteltu ominaisuuksien, kuten koon, tiheyden sekä solukalvon jäykkyyden perusteella. Myös dielektriforeesia käyttäen ollaan eroteltu CTC:itä niiden johtavuuden perusteella. Optiikkapohjaiset CTC:itä erottelevat laitteet eivät ole vielä laajalti tutkittuja korkean hinnan ja suuren koon takia. Magneetteja käyttävät CTC:iden erottelumenetelmät ovat mahdollisesti yleisimpiä. Näitä menetelmiä voidaan tehostaa myös rakenteellisilla ominaisuuksilla, kuten mikrorakenteilla laitteen sisäpinnoilla, jotka sallivat paremman kiinnittymisen vasta-aineisiin (Frankman *et al.* 2022, Kim *et al.* 2021, Mahhengam *et al.* 2021).

Kim työtovereineen (2021) valmistivat mikrofluidisen laitteen DIS- μ Chip:n, joka pystyy erottelemaan immunomagneettisilla nanopalloilla merkatut CTC:t normaaleista verisoluista. Mikropallot tarttuvat soluihin, jotka ilmentävät EpCAM:ia. Tutkimuksessa lisättiin 5 ml verinäytteeseen MCF7 soluja eroteltavaksi kolmella eri virtaustahdilla: 1,0 ml/h, 1,5 ml/h ja 2,0 ml/h. Kaikilla virtaustahdeilla MCF7 soluista saatiin eroteltua vähintään 94,8 %. Kuitenkin MCF7 solujen puhtaus oli vain 13,1–23,6 % lopullisissa tuloksissa. Tämä johtui valkosolujen kiinnittymisestä immunomagneettisiin nanopalloihin epäspesifisesti.

DIS- μ Chip:iä testattiin vielä kliinisessä pätevyystestissä. Kymmenen haimasyöpäpotilaan verestä pyrittiin eristämään CTC:itä kiinnittyen pan-cytokeratiini-positiivisiin soluihin. CD45-positiiviset solut tulkittiin valkosoluiksi. Haimasyöpänäytteistä vaan kahdeksasta eristettiin onnistuneesti CTC:itä. Keskiwertonäytteestä eristettiin 5,3 kiertävää syöpäsolua 6,3 keskihajonnalla. EMT:n aiheuttamat morfologiset muutokset CTC:iden pintaproteiineihin

attribuoitiin muita tutkimuksia matalamman tehokkuuden syyksi. Matalan tehokkuuden vuoksi artikkeli ehdottaa jatkossa käyttämään mesenkymaalikudosmarkkereita, kuten CD133:a ja vimentiniä haimasyövän CTC:iden erottelussa (Kim *et al.* 2021).

3.1.2. Rintasyövän tunkeutumispotentiaalın markkerien tutkiminen

Syöpätautien ominaisuudet, kuten leviämiskäyttäytyminen ja pintareseptorit vaihtelevat suuresti taudista toiseen. Yhdessä elimessä esiintyvät syövät ja kasvaimet pystyvät käyttäytymään monilla eri tavoilla. Duktaalinen karsinooma *in situ* (Ductal carcinoma *in situ*, DCIS) on hyvänlaatuinen rintakasvain. Kuitenkin DCIS toimii usein tunkeutuvan duktaalisen karsinooman (Invasive ductal carcinoma, IDC) esiasteena. Tunkeutuessa ympäröiviin kudoksiin IDC saattaa myös kehittyä metastaattiseksi rintasyöväksi. Tämän takia molekyylisten markkereiden, jotka ovat avainrooleissa DCIS:n kehittämisessä IDC:ksi, ymmärtäminen on tärkeää. Tarkat biomarkerit DCIS:n muutoksen alkamisesta ovat vielä jotenkuten epäselviä. Tutkimukset ovat osoittaneet samantyyppistä geenien ilmentämistä IDC:ssä ja sen esivaiheissa (Moon *et al.* 2020).

Kolme yleisesti tunnustettua pintareseptoria rintasyöville ovat estrogeenireseptori (ER), progesteronireseptori (PR) sekä ihmisen epidermaalisen kasvutekijän reseptori 2 (Human epidermal growth receptor 2, HER2). Nämä toimivat biomarkkereina tunkeutuvilla syöville. 75 % IDC:istä ilmentää normaalia enemmän ER:ää, 70 % PR:ää ja 10–40 % HER2:ta. Näiden reseptorien signaalikaskaadit ovat hyvin tutkittuja ja mahdollistavat syövän etenemisen ennustamisen. Kuitenkin noin 10 % rintasyöivistä ovat triplanegatiivisia rintasyöpiä (triple-negative breast cancer, TNBC), jotka eivät ilmennä näitä reseptoreja normaalia enempää. TNBC:iden tutkimista on suoritettu mikrofluidisilla malleilla (Frankman, 2022).

Moon työtovereineen (2020) tutkivat kolmen eri syöpäsolulinjan tunkeutumispotentiaalia maitorauhasta mallintavan epiteelisolukerroksen läpi kollageeni I -soluväliaineeseen. MDA-MB-231-, SUM-159PT- ja MCF7 -solulinjoja käytettiin tutkimuksessa. Näistä MDA-MB-231 ja SUM-159PT ovat TNBC-soluja, joita pidetään yleisesti aggressiivisempina, kuin muita rintasyövän alalajeja. Molemmat TNBC-solulinjat ilmentävät vahvasti EMT:tä edistäviä genejä sekä kasvattavat motiliteettia ja solujen erilaistumista. MCF7 solulinja sen sijaan ei ilmennä tunkeutumista edistäviä genejä *in vivo* -olosuhteissa. Tämä tutkimus onnistui toistamaan tämän tuloksen mikrofluidista mallia käyttäen. MDA-MB-231 sekä SUM-159PT

molemmat tunkeutuivat ulos maitorauhasmallista kollageeni I -soluväliaineeseen. MCF7 ei tunkeutunut. Syöpäsolut merkattiin fluoresentisti anti-CD24:llä ja anti-CD44:llä virtaussytometriaa varten. TNBC-solut ilmensivät CD24:ä enemmän, kuin verrokiksi kaksiulotteisessa kulttuurissa kasvatetut solut. IDC:issä CD24-positiivisuus on yhdistetty lyhyempään potilaiden keskivertoiseen selviämiseen. DCIS:n muutoksen IDC:ksi tarkastelu kuitenkin on vajavaista tällä menetelmällä, sillä molemmat TNBC-solulinjat olivat jo valmiiksi tunkeutuvia ja EMT:tä edistäviä ominaisuuksia ilmentäviä. Tutkimus toimi enemmänkin pohjana jatkotutkimukselle. Malli ei sisältänyt ollenkaan fibroblasteja, sytokiineja ja monia muita oleellisia soluja, ja sen lisäksi gradientit, kuten happi ja hapokkuus jäivät mallissa täysin huomioimatta.

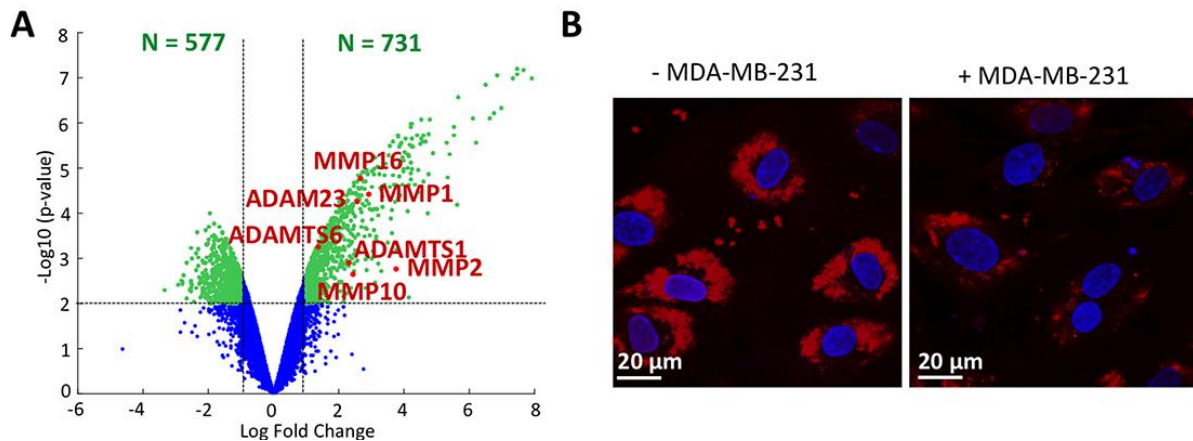
3.1.3. Syövän ekstravasaatiopotentiaalin tutkiminen

Usein syöville on taipumus suosia tiettyä elintä tai tiettyä elimiä metastaasin kohteena. Luminaalityyppinen rintasyöpä on esimerkiksi 2,5 kertaa todennäköisempi muodostamaan etäpesäkkeitä luumun, kuin perustyyppinen rintasyöpä. Perustyyppinen rintasyöpä taas muodostaa 2,5 kertaa todennäköisemmin keuhkometastaaseja. Tämä taipumus johtuu vuorovaikutuksista syöpätyypin ja kudoksen välillä. Verenkierron kuviot sekä mikroympäristöt kudoksessa vaikuttavat kasvaimien todennäköisyyteen kohdistaa tiettyä kudosta. (Bado et al. 2021, Bersini et al. 2018)

Glykokalyksi on endoteelistä solukerrosta suojaava rakenne. Glykokalyksi koostuu proteoglykaaneista, glykoproteiineista ja glykolipideistä. Glykokalyksin rooleihin kuuluu verisuoniston permeabiliteetin ylläpitäminen, leikkausjännityksen mekanosensorina toimiminen sekä adheesion salliminen endoteelikerrokseen. Glykokalyksi on oleellinen suojaerros ylimääräistä kuormitusta vastaan. Kuitenkin glykokalyksin ohentuessa esimerkiksi tulehduksen tai liiallisen veren leikkausjännityksen takia proteaasit voivat päästä käsiksi endoteeliin aiheuttaen glykokalyksin rappeutumista. CTC:iden on osoitettu aiheuttavan glykokalyksin rappeutumista, mutta tähän osallistuvia proteaaseja ei olla selkeästi esitetty. Kuitenkin tiedetään, että matriksimetalloproteaasit (MMP) osallistuvat syndekaanien irrottamiseen (Bersini *et al.* 2018).

Bersini työtovereineen (2018) tutkivat miten syöpäsolun keskinäinen kommunikaatio, kommunikaatio epiteelisolujen kanssa sekä kommunikaatio luuerilaistuneiden (Osteo-

differentiated, OD) ihmisen luuytimestä saatujen mesenkymaalisten kantasolujen kanssa (human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, hBM-MSC-s) vaikuttavat syövän ekstravasaatiopotentiaaliin mikrofluidisessa mallissa. Tutkimuksessa tarkkailtiin MDA-MB-231 rintasyövän, T24 virtsarakkosyövän ja OVCAR-3 munasarjasyövän ekstravasaatiopotentiaalia PDMS laitteessa luuta mallintavaan mikroympäristöön. Mikroympäristö valmistettiin käyttämällä kollageeni I:tä ja lisäämällä OD hBM-MSC:itä. Kontrollina käytettiin kollageenia ilman lisättyjä soluja. Tutkimuksessa suoritettiin myös koe, jossa tutkittiin MDA-MB-231 solujen vaikutusta glykokalyksin rakenteen poikkeavuuksiin. Kokeessa visualisoitiin glykokalyksin rakenne käyttäen lektiinivärjäystä. Lektiniit sitoutuvat glykokalyksin hiilihydraattipainotteiseen rakenteeseen. MDA-MB-231 soluja sisältävässä mallissa glykokalyksin rakenne degratoitui huomattavasti verrattuna kontrolliin. (Kuva 2.)



Kuva 2. Glykokalyksin degradaatio.

A) Tulivuorikuvaaja mikrokaivokokeen datasta. Punaiset nimetyt pisteet vastaavat glykokalyksin degrataation markkereita. B) Endoteelinen glykokalyksi leimattu lektiinivärjäyksellä (TRITC). Oikealla sisältäen MDA-MB-231 soluja mikrokanavassa ja vasemmalla ilman MDA-MB-231 soluja mikrokanavassa. Solujen tumat ovat värjätty sinisellä (Hoechst) (Bersini et al. 2018).

Tutkimuksessa tehtiin myös mikrokaivokoe, jossa solut läpäisivät endoteelikerroksen. Tämän jälkeen soluille tehtiin geenin ilmentämisanalyysi. Geenien ilmentäminen todennettiin aluksi olevan erilainen endoteelikerroksen läpäisseillä soluilla. Endoteelin läpäisseet solut huomattiin geenintologisesti ilmentävän myöhäiselle metastaasille tyypillisiä angiogeneesin piirteitä, kuten verisuoniston kehitystä ja verenkierron kehitystä. Muutamien syöpäsolujen migraatioon, tunkeutumispotentiaaliin sekä metastaasin muodostumispotentiaaliin vaikuttavien geenien,

kuten SPARC ja MGP, todettiin olevan huomattavasti yli-ilmentyneitä endoteelin läpäisseissä rintasyöpäsoluissa (Bersini *et al.* 2018).

Ekstravasaatiopotentiaalin tutkimisessa oletuksena oli, että MDA-MB-231 sekä TK24 tunkeutuisivat luun mikroympäristöä mallintavaan matriksiin, kun taas OVCAR-3 osoittaisi tätä huomattavasti pienemmissä määrin. Kuitenkin OVCAR-3 soluista yli 50 % tunkeutui luumikroympäristöön. Prosenttiluku oli 60–70 % toisilla syövillä. Kliinisissä tapauksissa munasarjasyövän metastaasi muodostui luuhun vain 0,82 % tapauksista. Huomattava ero tutkimuksen tuloksissa ja kliinisessä datassa voi johtua myös mahdollisesti munasarjasyövän kykenemättömyydestä muodostaa sekundaarista kasvainta luuhun ekstravasaation jälkeen. Kuitenkin on mahdollista, että tutkimuksessa käytetyt *in vitro* -menetelmät eivät mallinna täysin tarkasti ihmisen kehon monimutkaisuutta. Tutkimuksen mukaan geeninilmennysdataa voidaan käyttää glykokalyksin degradaation roolin tutkimisessa eri mikroympäristöihin ekstravasoitumista tutkiessa, sekä syöpäsolujen ekstravasaatiopotentiaalin arvioimisessa (Bersini *et al.* 2018).

3.2. Syövän hoitamisen tutkiminen mikrofluidisilla malleilla

Perinteisesti syöpää on hoidettu kemoterapian, säteilyterapian, immunoterapian ja kirurgisesti kasvaimien operoimisen keinoin. Syöpätutkimuksen pitkästä historiasta huolimatta on syöpälääkkeiden hyväksymisprosentti käyttöön vain 5 %. Suuri vaikuttaja tähän on, että nykypäivänä suuri osa syöpälääkkeistä testataan eläinkokeilla hiirissä. Eläinkokeet kuitenkin ovat vajavaisia ihmisen fysiologisten reaktioiden ennustamisessa erilaisiin hoitoterapioihin. Vajavaisuus johtuu muun muassa immuunipuolustuksen eroissa, kuten antigeenin esittelyn välttelyssä, immuunivasteen ilmentämisen lisäämisessä sekä immuunipuolustuksen tukahduttamisen määrässä. Myös tietyt solut puuttuvat kokonaan hiiristä, kuten tietyt gamma-delta-T-solut. TGN1412-lääkkeen ensimmäisissä ihmiskokeissa ilmeni vakavia sivuvaikutuksia. CD28 ilmentymisero hiiren ja ihmisen immuunisoluissa oli syy reaktioon. Tämä oli jäänyt huomioimatta esikliinisessä vaiheessa, sillä kokeissa käytettiin eläinmalleja (Maulana *et al.* 2021).

Mikrofluidisen mallin valmistaminen voidaan suorittaa spesifisesti tiettyä syöpää varten. Syöpien mikroympäristöt, gradientit sekä immuunivasteet voidaan mallintaa tarkasti tiettyä tutkimusta varten. Muokattavuus mallissa mahdollistaa tietyn ominaisuuden tarkemman

tarkastelun. Mikrofluidisten mallien etuna toimii myös läpinäkyvä rakenne, joka mahdollistaa helpon jatkuvan visualisoinnin tapahtuvista reaktioista (Maulana *et al.* 2021).

Mikrofluidisten mallien suuresta potentiaalista huolimatta vain pieni osa kaikista kokeista sisältää immuunisoluja. Suurin osa immuunisoluja sisältävistä mikrofluidisista kokeista tutkivat joko potilaskohtaisia reaktioita lääkeaineisiin tai yksittäistä vaihetta metastaattisesta kaskadista (Graney *et al.* 2021).

Potilaskohtaiset mallit ovat malleja, joissa käytetään syöpäkudosta tai syöpäsoluja, jotka ovat saatu suoraan potilaasta. Malleissa käytetään usein myös muita mikroympäristölle tärkeitä soluja. Usein vähintään käytettävät immuunisolut otetaan itse potilaan syövän mikroympäristöstä. On huomattu, että tiettyjen syöpien geenien ilmentäminen vaikuttaa suuresti syöpähoitojen tehokkuuteen. Esimerkiksi HER2 ilmentäviä rintasyöpähoitoja ja epidermaalisen kasvutekijän reseptorin (Epidermal growth factor receptor, EGFR) ilmentäviä keuhkosyöpähoitoja on kehitetty. Tätä periaatetta noudattaen potilaskohtaiset mallit koittavat tutkia potilaan syövän reaktioita erilaisiin syöpähoitoihin ennusteen luomista varten. (Graney *et al.* 2021, Letai *et al.* 2022)

3.2.1. Immuno-onkologian menetelmiä

Immuno-onkologia eli syövän immunoterapia perustuu keinoihin hoitaa syöpää aktivoimalla potilaan kehon omia soluja syöpää vastaan. Immunoterapian keinoihin kuuluu muun muassa immuunivasteen vapauttajien (Immune checkpoint inhibitor, ICI) käyttö, sytokiiniterapia, adoptoiva solusiirräntäterapia (Adoptive cell transfer therapy, ACT), onkolyttiset virukset sekä syöpärokotteet (Paterson *et al.* 2021).

ICI-terapia on tehokkain immunoterapia tällä hetkellä. ICI-terapiassa inhiboidaan T-solujen toimintaa rajoittavia molekyylejä. Käyttämällä sytotoksisen T-lymfosyytti-liitetyn antigeeni 4:n (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4) vasta-ainetta voidaan saavuttaa korkeampaa aktiivisuutta T-soluista. Toiset laajalti tutkitut T-solujen aktiivisuutta heikentävät aineet ovat ohjelmoitu solukuolema 1 (Programmed cell death 1, PD-1) ja ohjelmoitu solukuolema 1 ligandi (Programmed cell death 1 ligand, PD-L1) (Paterson *et al.* 2021).

Sytokiiniterapia on terapia, jossa immuunireaktioita vahvistavia sytokiineja käytetään aktivoimaan immuunisoluja. Aineita, kuten interferoneja tai interleukiineja, voidaan kuljettaa kohteeseen nostamaan T-solu vastetta tai nopeuttamaan dendriittisolujen kypsymistä. Esimerkiksi interferoni alfa ($\text{IFN-}\alpha$) voidaan käyttää nostamaan dendriittisolujen aktiivisuutta antigeenin esittämisessä ja täten nostamaan immuunivasteen suuruutta. Kuitenkin lyhyen puoliintumisajan takia sytokiinejä täytyy käyttää suurissa määrin vaikutuksien saavuttamista varten. Tämä voi aiheuttaa vakavia sivuvaikutuksia, kuten sytokiinioireyhtymää tai autoimmuunireaktioita (Maulana et al. 2021, Paterson et al. 2021).

ACT terapiassa syöpään lisätään immuunisoluja, jotka ovat joko otettu luovuttajalta tai itse potilaasta ja sitten muokattu geenitekniikalla. T-soluihin voidaan lisätä antigeenireseptoria koodaava geeni, joka mahdollistaa syövän pintaproteiinien tunnistamisen. Tällaiset T-solut tunnetaan kimeerisinä antigeenireseptorisoluina (Chimeric antigen receptor, CAR). CAR-T-solut sekä CAR-luonnolliset tappajasolut (Natural killer, NK) kuitenkin kärsivät usein vaikeuksista immuunitukahduttavan syövän mikroympäristössä (Wang *et al.* 2021).

Onkolyttiset virukset käyttävät syöpäsoluja isäntäsoluinaan. Näiden virusten tarkoituksena hoidossa on tuhota syöpäsoluja ja aktivoida ympäröivää immuunipuolustusta ja opettaa sitä tunnistamaan syöpäsoluja (Maulana *et al.* 2021).

Syöpärokotteet voivat toimia monilla tavoilla, mutta eniten tutkittu tyyppi on dendriittisolurokotteet. Dendriittisolurokotteet aktivoivat dendriittisoluja nostamalla T-solujen aktiivisuutta. Kuitenkin syöpärokotteilla on vielä tällä hetkellä heikosti kliinistä näyttöä ja paljon parantamisen varaa löytyy (Paterson *et al.* 2021).

3.2.2. Kemoterapia

Kemoterapia on terapia, jossa käytetään lääkkeitä syöpäsolujen tuhoamiseen. Lääkkeiden toimintaperiaate perustuu usein syöpäsolujen hallitsemattoman jakautumisen kohdistamiseen. Tämän takia lääkkeitä kutsutaan usein solusalpaajiksi. Kemoterapiassa käytetyt lääkkeet eivät pysty erottamaan terveitä soluja syöpäsoluista. Kuitenkin kohdistamalla vaikutuksia solusyklin keskeyttämiseen, kemoterapia tuottaa enemmän vahinkoa syöpäsoluihin. Useimmin kemoterapiassa käytetyt lääkkeet jaetaan muutamaaan kategoriaan toimintamekanismien mukaan. Alkyloivat aineet toimivat tuhoamalla DNA:ta soluissa. Tämä estää solusyklin

etenemisen ja solujen jakautumisen. Nitrosoureat ovat alkyloivia aineita, jotka kykenevät läpäisemään aivoihin johtavan kalvon. Niitä voi tämän takia käyttää aivosyövän hoidossa. Antimetaboliitit estävät DNA:n ja RNA:n jakautumista. Tämä estää solua jakautumasta. Nukleiinihappojen jakautumista voidaan estää inhiboimalla jotain vaikuttavaa entsyymiä prosessissa. Esimerkiksi desitabiini (DAC) ja atsasitidiini inhiboivat DNA-metyylitransferaasia estäen DNA:n metyloinnin. Sytotoksiset antibiootit ovat bakteereista saatuja aineita, jotka sitoutuvat geneettiseen materiaaliin estäen solun jakautumisen. Topoisomeraasit ovat entsyymejä, jotka irrottavat DNA:n juosteita replikaatiota varten. Topoisomeraasin estäjiä voidaan käyttää solunsalpaajana syöpähoidossa. Mitoosin estäjät vaikuttavat johonkin solussa ilmentyvän proteiinin tai rakenteen toimintaan tai rakenteeseen estäen mitoosin. Esimerkiksi paklitakseli estää solun mitoosin sekä aiheuttaa apoptoosia häiritsemällä mikrotubulusten rakennetta solun sisällä. Solunsalpaajia, jotka eivät kuulu mihinkään aiemmista kategorioista, on myös olemassa (American cancer society, 2019).

3.2.3. Desitabiinin vaikutuksen tutkiminen sytokiinihoidon tehokkuuteen

Esikliniset tutkimukset ovat osoittaneet desitabiinin nostavan luokan I merkittävän histokompatibiliteettikompleksin (major histocompatibility complex, MHC) ja syöpä/kives (Cancer/testis, CT) antigeenien ilmentämistä. Desitabiinin on osoitettu vaikuttavan kohottavasti syövän vastaiseen immuunipuolustukseen näillä menetelmillä (Lucarini et al. 2017).

Tyyppin 1 interferonit (Interferon type 1, IFN-I) ovat sytokiinejä, jotka toimivat immuunireaktioiden säätelijöinä. Ne aktivoivat dendriittisoluja, NK-soluja sekä oletettua T-solun pinta glykoproteiinia, eli tunnisterakenne 8:aa (Cluster of differentiation 8, CD8) ilmentäviä T-soluja. Tämän lisäksi IFN-I:t lievittävät immuunireaktion tukahtumista vähentämällä muun muassa säätelijä-T-solujen aktiivisuutta. Kuitenkin epigeneettinen säätely voi rajoittaa tyyppin 1 interferonien tehokkuutta metyloimalla interferonistimuloitua geeniä (Lucarini et al. 2017).

Lucarini työtovereineen (2017) tutkivat desitabiinin vaikutusta IFN-I sytokiinihoidon tehokkuuteen ihmisen sekä hiiren melanoomasoluissa. Tutkimus suoritettiin kokeilla *in vivo* -olosuhteissa hiirissä sekä *in vitro* -olosuhteissa. Hiiren melanoomasolulinjaa B16 käytetään mallintamaan ihmisen syöpiä. Näistä soluista tehtiin kaksisolulotteinen *in vitro* -soluelävyysanalyysi, jossa todettiin sekä DAC:llä että IFN-I:llä käsiteltyjen solujen osoittavan

pienempiä soluelävyysarvoja kuin kontrollit. Kontrollit olivat käsitelty vain toisella DAC:stä tai IFN-I:stä tai ne eivät olleet lainkaan käsiteltyjä. Myös apoptoosin markkereita tutkittiin näytteissä värjäyksellä, ja DAC+IFN-I näytteet osoittivat korkeampaa frekvenssiä sekä solunsalpausta G2/M -vaiheessa solusykliä.

Hiirikokeessa verrattiin DAC+IFN-I terapian vaikutusta hiiren melanoomakasvaimen kasvuun Matrigel tukosanalyysillä (Lucarini *et al.* 2017). DAC+IFN-I näytteiden tuottamissa tukoksissa huomattiin huomattavasti korkeampia prosenttiarvoja CD45+ sekä CD8+ valkosoluja. Hematosykliini- eosinivärjäys osoitti myös korkeita syöpäsolujen nekroosiarvoja DAC+IFN-I käsitellyille soluille.

Kolmiulotteisessa *in vitro* -mallissa ihmisen melanoomasyöpälinjat A375, SK-MEL-28, SC sekä WM793 osoittivat matalampaa soluelävyyttä DAC+IFN-I käsittelyn jälkeen, kuin kontrollit. Sferoidimalleja käytettiin tutkimaan käsittelyn tehokkuutta kasvun nopeuteen. DAC+IFN-I käsiteltyjen mallien koko kymmenen päivän kasvun jälkeen erosi huomattavasti muista. Halkaisija DAC+IFN-I sferoidille oli 158 µm, DAC käsitellylle 200 µm, IFN-I käsitellylle 254 µm ja käsittelemättömälle kontrollille 240 µm (Lucarini *et al.* 2017).

Mikrofluidista mallia käytettiin tutkimaan terveistä potilaista saatujen immuunisolujen liikettä syöpäsoluja kohti. Malli valmistettiin PDMS:stä. Sen rakenne koostui kolmesta päänestekanavasta, joita yhdisti kaksi geelikanavaa. Immuunisolut kerättiin potilaiden veren sentrifugoidusta valkosolukerroksesta. Syöpä- ja immuunisolut merkattiin fluoresenteilla väreillä niiden toiminnan seuraamista varten. Visualisointi suoritettiin fluoresentin mikroskopian keinoin. Mikrofluidista mallia käytettiin tässä tutkimuksessa visualisoimaan solujen liikettä. Helposti kuvattavalla mallilla voidaan tuottaa kvantitatiivisesti mitattavaa dataa helpommin (Lucarini *et al.* 2017).

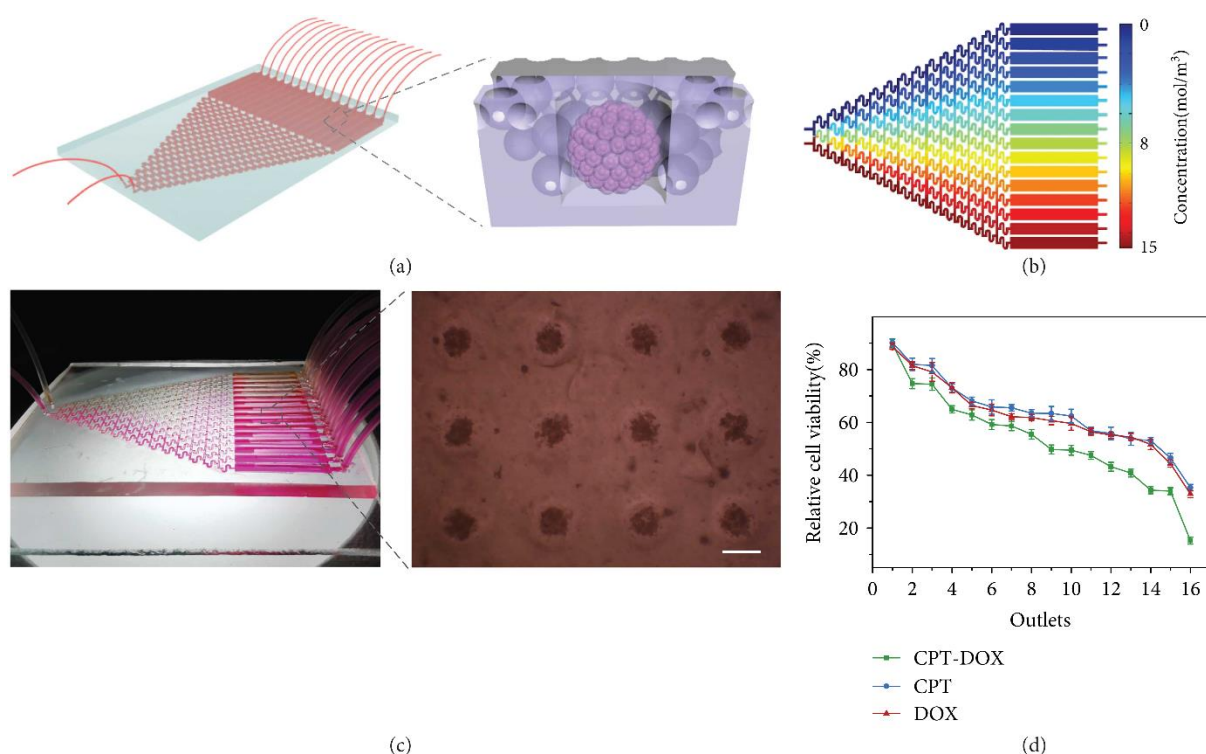
Mikrofluidisella mallilla suoritettussa kokeessa käytettiin samoja syöpäsolulinjoja, kuin kolmiulotteisessa *in vitro* -mallissa. Sivunestekanavien läpi kuljetettiin jatkuvasti soluviljelyainetta. Geelikanaviin lisättiin syöpäsoluja Matrigelissä joko DAC:n, IFN-I:n, ei kummankaan kanssa tai molempien kanssa. Mallin rakenteen takia oli mahdollista seurata immuunisolujen liikkumista puolelle tai toiselle verraten samalla eri käsittelyjen vaikutuksia syöpäsolujen immuunisolujen puoleensa vetämiseen. Kaikilla syöpäsolulinjoilla tehdyt kokeet

osoittivat immuunisolujen suurinta liikkumista kohti DAC+IFN-I käsiteltyjä soluja (Lucarini *et al.* 2017).

3.2.4. Korkean läpisyötön mikrofluidiset mallit potilaskohtaiselle syöpähoidolle

Potilaskohtaisia mikrofluidisia malleja on valmistettu viime vuosina tutkimaan syöpähoitojen mahdollisuuksia. Potilaskohtaista syöpähoitoa suorittaessa usein etsitään syöpätyypille tai tarkemmin potilaan syövälle tehokkainta lääkintävastausta tai konsentraatiota. Tämän tyyppistä hoitoa varten voidaan käyttää korkean läpisyötön menetelmiä, jotka mikrofluidiset mallit mahdollistavat. Korkean läpisyötön menetelmissä testataan erilaisia lääkkeitä tai konsentraatioita lyhyessä ajassa. Mikrofluidisten mallien systemaattisuuden takia ne sallivat korkean toistettavuuden ja paremman tarkkuuden, kuin kaksiulotteiset mallit (Letai *et al.* 2022).

Zhu työtovereineen (2021) rakensivat mikrofluidisen mallin, jota voidaan käyttää tarkkailemaan eri lääkeaine konsentraatioiden vaikutusta syöpäsoluihin. Kokeessa käytettiin heptosellulaarisen karsinooman soluja HepG2. Mikrofluidisen mallin rakenne perustui maksaan. Tuottaakseen maksaa kuvaavan mallin valmistettiin aluksi hydrogeeli, joka mukaili maksan kudoksen muotoja. PDMS muotilla tuotettiin reiät, jotka mallinsivat isoja maksalohkon verisuonia ja käyttäen piidioksidia valmistettiin pieniä nanorakenteita. Mallin päälle valutettiin PEDGA:n ja gelatiini-metakryolyylin (Gelatin methacryloyl, GelMA) sekoitusta, joka polymerisoinnin jälkeen poistettiin sisältäen piidioksidin tuottamat nanohuokokset, jotka mallinsivat isoja verisuonia ympäröiviä solujen välisiä verisuonia. Tämä maksaa mallintava hydrogeeli asetettiin joulukuusimalliseen mikrofluidiseen laitteeseen, jonka läpi soluviljelynestettä pääsee virtaamaan halutun konsentraation kanssa lääkettä. Mallin tehokkuutta testattiin lisäämällä HepG2 sferoideja sekä 16 eri konsentraatiota joko topoisomeraasin estäjä kamptotesiiniä (CPT), sytotoksista antibioottia doksorubisiinia (DOX) tai molempia. Soluelävyttä verrattiin lopuksi. Suuremmat konsentraatiot solusalpaajia toimivat oletetusta soluelävyttä vähentäen. Eri solusalpaajien tehokkuutta voidaan verrata tehokkaasti eri konsentraatioissa tällä menetelmällä. Tietenkin kliinisissä olosuhteissa tulee ottaa huomioon käytettävän solusalpaajan toksisuuden vaikutukset kehoon. (Kuva 3.)



Kuva 3. Hierarkkisen hydrogeelin soveltaminen järjestetyllä mikro-nano-rakenteella maksasyöpäsiru systeemillä.

(a) kaavio maksasyöpäsirun valmistamisesta. (b) Konsentraatiogradientin simulaatio maksasyöpäsirulla (c) Sivukuva maksasyöpäsirusta. Mittakaava = 200 μm . (d) lääketestien tulokset DOX:lle, CPT:lle ja DOX-CPT:lle. (Zhu et al. 2021)

3.3. Syövän ominaisuuksien tutkiminen mikrofluidisilla malleilla

Syövällä on monia ominaisuuksia, jotka vaikuttavat sen kasvuun, toimintaan, ominaisuuksiin ja sen aiheuttamaan uhkaan potilaalle. Näiden ominaisuuksien tutkiminen ja ymmärtäminen on oleellista hoitokeinoja keksiessä ja kehittäessä. Tämän lisäksi mikroympäristön vaikutukset ovat vaikuttavat syöpäsolujen fenotyypiin. Luuhun metastastoituneen rintasyövän on havaittu ilmentävän korkeaa fenotyypistä vaihtelevuutta. Estrogeenisen reseptorin ilmeneminen hiljenee ja aiheuttaa endokriiniresistenssiä. Tämän lisäksi luumetastaasin edetessä ilmeneminen saattaa uudelleen aktivoitua osassa soluista aiheuttaen korkeaa heterogeenisyyttä (Bado et al. 2021).

Mikrofluidisten mallien muokattavuuden takia varsinkin syövän mikroympäristön ominaisuuksien kuten, hypoksian ja pH muutosten tutkiminen on tehokasta. Molemmat ovat vahvasti linkitetty metastaasin syntyyn. Itse sekundaarisen kasvaimen tutkiminen vaatii

monimutkaisen mallin, jossa täytyy harkita muun muassa usean eri elimen viestintää ja immuunipuolustuksen vaikutuksia (Yan *et al.* 2013).

Terveet ihmisen solut tuottavat valtaosan adenosiinitrifosfaattivarastoistaan sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun kautta. Syöväälle tämä ei ole aina totta. Syövän hallitsemattoman laajenemisen ja heikkojen verisuonien takia aiheutuvan hypoksian seurauksena tuotetaan syövän energiavarastoista suurempi osa glykolyysin kautta. Hapen puutos kudoksessa aiheuttaa glykolyysin anaerobisen energiatuotannon, jonka myötä valmistuu maitohappoa (Yan *et al.* 2013).

Syövän metastaasin johtavien morfologisten muutosten on huomattu monessa yhteydessä olevan linkitettyinä epäsuotuisiin kasvuolosuhteisiin. Tämän takia rakentaessa mikrofluidista mallia, joka tutkii intravasatiota, on oleellista mallintaa myös happamoitumista, joka ilmenee kasvaimessa (Frankman *et al.* 2022).

Yan työtovereineen (2013) rakensivat paperipohjaisen mikrofluidisen mallin syövän happamoitumisen mallintamista varten. Paperipohjainen malli valittiin, sillä monet kerrokset paperia mahdollistivat syövän tiukkaan pakkaamisen ja kerrosten välisen imeytymisen. Aikaisemmin valmistetuissa kaksi ulotteisissa malleissa on happamien olosuhteiden tutkiminen ollut hankalaa kudoksen löyhän rakenteen takia. Mikrofluidinen malli myös mahdollisti heikentyneen verenkierron kasvaimen mallintamisen. Monikerroksinen rakenne myös mahdollisti tuloksia tutkiessa kerroskohtaisten tulosten analysoinnin. Tutkimuksessa käytettiin rintasyövän solulinjaa MCF7. Gelatiinilla käsiteltyjä nitroselluloosamembraaneja käytettiin laitteessa solujen alustana ja laitteen runko oli valmistettu PDMS:stä. Solut jaoteltiin tasaisesti kahdeksalle kerrokselle membraania. Laitteen päällä sijaitti soluviljelyaineen kuljetusjärjestelmä. Kehossa ilmentyvän syövän hypoksia ja täten happamuus kasvavat verisuonista pois liikkeessä. Kuitenkin Yan työtovereineen laitteessa kahdeksasta membraanista keskimmäiset membraanit 4 ja 5 osoittivat korkeimpia laktaasitasoja sekä matalimpia jakaantumistasoja. Samat tulokset huomattiin kolmella virtaustahdilla. Sekä 15 $\mu\text{l/h}$, 60 $\mu\text{l/h}$, että 120 $\mu\text{l/h}$ toistivat keskimmäisien membraanien korkean happamuuden. Kuitenkin virtaustahdin noustessa voitiin huomata pohjimmaisten membraanien laktaasitasojen olevan korkeampi, kuin päällimmäisten. Tästä voitiin olettaa, että pohjimmaisten kerrosten matala laktaasitaso verrattuna keskikerroksiin, johtuvan PDMS rungon hengittävyyydestä. Tutkiessa membraanien solutiheyttä huomattiin kokeen seitsemäntenä päivänä keskimmäisten solujen

määrän olevan huomattavasti pienempi. Yan työtovereineen (2013) oletivat tämän osoittavan solujen siirtymisen lähemmäksi happipitoisempia kerroksia.

4. Mikrofluidisten mallien tulevaisuus metastaasitutkimuksessa

Parannuksia mikrofluidisiin malleihin täytyy vielä tehdä kliinisesti pätevien tuloksien saamista varten. Mallien rakentamisessa useimmiten käytetty materiaali on PDMS. Kuitenkin PDMS:llä on tunnetusti ongelmia, joita esimerkiksi termoplastiset materiaalit voivat välttää. Vastaavasti biotulostamisen tekniikoissa on uusien biomusteiden löytäminen tarpeellista. Biotulostaminen osoittaa tällä hetkellä teknologioiden kehittyessä valtavaa lupausa syöpätutkimuksen tulevaisuudessa tarkan rakenteen valmistamisen takia elintasolla (Monjezi et al. 2021).

Potilaskohtaiset mikrofluidiset mallit ovat vielä alkuvaiheissa. Monet mikrofluidiset mallit käyttävät tutkimuksissansa solulinjoja, jotka osoittavat tiedettyjä mahdollisesti tutkimukselle edullisia ominaisuuksia. Potilaskohtaiset mallit voivat mahdollistaa tulevaisuudessa mikrofluidisten mallien käytön laajasti kliinisissä olosuhteissa sekä antaa mikrofluidisella metastaasitutkimukselle laajempaa näyttöä (Monjezi et al. 2021).

Metastaattisen syövän hoitoa tutkiessa mikrofluidisilla malleilla on tulevaisuudessa tärkeää tutkia monen elimen vaikutusta kokonaisuuteen. Myös syövän metastaasia tutkiessa täytyy useiden elimien vaikutuksia harkita mikroympäristön muodostumisessa ja käyttäytymisessä. Metastaasitutkimus suoritetaan usein osissa mikrofluidisissa malleissa. Tulevaisuudessa tulee rakentaa metastaasimalleja, joissa koko metastaattinen kaskadi tapahtuu yhden mallin sisäisesti. Tähän vaaditaan vähintään primaarielin malli sekä sekundaari elinmalli, johon syöpäsolut metastoituvat (Graney et al. 2021).

Immuunisysteemin mallintaminen syöpää tutkiessa on äärimmäisen tärkeää. Tulevaisuudessa suurempaa määrää erilaisia immuunisoluja tulisi käyttää tehdessä immuunipäteviä mikrofluidisia syöpämalleja. Immuunisolut, kuten säätelijä-T-solut, ovat jääneet monista nykyisistä malleista huomioimatta. Myös immuunipuolustuksen erot syövän kohde-elimissä täytyy huomioida. Lihavuuden aiheuttama jatkuva tulehdustila adipoosikudoksessa johtaa T-solujen uupumiseen. Vastaavia tilanteita tulee pystyä mallintamaan tuottaakseen tarkkoja immuuniterapian malleja tulevaisuudessa (Maulana et al. 2021).

Mikrofluidisten mallien rooli syöpätutkimuksessa tulee luultavasti vain kasvamaan tulevaisuudessa. Mikrofluidisilla malleilla on potentiaalia tuottaa luotettavampia tuloksia korkealla toistettavuudella. Tämän saavuttamiseksi tulee kuitenkin jatkaa laitteiden parantelua sekä mikroympäristön ja kasvaimen tarkempaa mallintamista.

Kirjallisuusviitteet

- Ahmed, M. A. M., & Nagelkerke, A. (2021). Current developments in modelling the tumour microenvironment *in vitro*: Incorporation of biochemical and physical gradients. *Organs-on-a-Chip*, 3, 100012. <https://doi.org/10.1016/j.ooc.2021.100012>
- American cancer association. (2019, November 22). *How chemotherapy drugs work*. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>
- Bado, I. L., Zhang, W., Hu, J., Xu, Z., Wang, H., Sarkar, P., Li, L., Wan, Y.-W., Liu, J., Wu, W., Lo, H. C., Kim, I. S., Singh, S., Janghorban, M., Muscarella, A. M., Goldstein, A., Singh, P., Jeong, H.-H., Liu, C., ... Zhang, X. H.-F. (2021). The bone microenvironment increases phenotypic plasticity of ER+ breast cancer cells. *Developmental Cell*, 56(8), 1100-1117.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.008>
- Bersini, S., Miermont, A., Pavesi, A., Kamm, R. D., Thiery, J. P., Moretti, M., & Adriani, G. (2018). A combined microfluidic-transcriptomic approach to characterize the extravasation potential of cancer cells. *Oncotarget*, 9(90), 36110–36125. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26306>
- Frankman, Z. D., Jiang, L., Schroeder, J. A., & Zohar, Y. (2022). Application of Microfluidic Systems for Breast Cancer Research. *Micromachines*, 13(2), 152. <https://doi.org/10.3390/mi13020152>
- Graney, P. L., Tavakol, D. N., Chramiec, A., Ronaldson-Bouchard, K., & Vunjak-Novakovic, G. (2021). Engineered models of tumor metastasis with immune cell contributions. *IScience*, 24(3), 102179. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102179>
- Kim, J., Cho, H., Kim, J., Park, J. S., & Han, K.-H. (2021). A disposable smart microfluidic platform integrated with on-chip flow sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 176, 112897. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112897>

- Letai, A., Bhola, P., & Welm, A. L. (2022). Functional precision oncology: Testing tumors with drugs to identify vulnerabilities and novel combinations. *Cancer Cell*, *40*(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.12.004>
- Liu, X., Fang, J., Huang, S., Wu, X., Xie, X., Wang, J., Liu, F., Zhang, M., Peng, Z., & Hu, N. (2021). Tumor-on-a-chip: from bioinspired design to biomedical application. *Microsystems & Nanoengineering*, *7*(1), 50. <https://doi.org/10.1038/s41378-021-00277-8>
- Lucarini, V., Buccione, C., Ziccheddu, G., Peschiaroli, F., Sestili, P., Puglisi, R., Mattia, G., Zanetti, C., Parolini, I., Bracci, L., Macchia, I., Rossi, A., D’Urso, M. T., Macchia, D., Spada, M., de Ninno, A., Gerardino, A., Mozetic, P., Trombetta, M., ... Mattei, F. (2017). Combining Type I Interferons and 5-Aza-2'-Deoxycytidine to Improve Anti-Tumor Response against Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, *137*(1), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.08.024>
- Mahhengam, N., fahem ghetran Khazaali, A., Aravindhan, S., Olegovna Zekiy, A., Melnikova, L., & Siahmansouri, H. (2021). Applications of Microfluidic Devices in the Diagnosis and Treatment of Cancer: A Review Study. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1922870>
- Maulana, T. I., Kromidas, E., Wallstabe, L., Cipriano, M., Alb, M., Zaupa, C., Hudecek, M., Fogal, B., & Loskill, P. (2021). Immunocompetent cancer-on-chip models to assess immuno-oncology therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *173*, 281–305. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.015>
- McGovern, J. A., Bock, N., Shafiee, A., Martine, L. C., Wagner, F., Baldwin, J. G., Landgraf, M., Lahr, C. A., Meinert, C., Williams, E. D., Pollock, P. M., Denham, J., Russell, P. J., Risbridger, G. P., Clements, J. A., Loessner, D., Holzapfel, B. M., & Hutmacher, D. W. (2021). A humanized orthotopic tumor microenvironment alters the bone metastatic tropism of prostate cancer cells. *Communications Biology*, *4*(1), 1014. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02527-x>
- Monjezi, M., Rismanian, M., Jamaati, H., & Kashaninejad, N. (2021). Anti-Cancer Drug Screening with Microfluidic Technology. *Applied Sciences*, *11*(20), 9418. <https://doi.org/10.3390/app11209418>
- Moon, H., Ospina-Muñoz, N., Noe-Kim, V., Yang, Y., Elzey, B. D., Konieczny, S. F., & Han, B. (2020). Subtype-specific characterization of breast cancer invasion using a microfluidic tumor platform. *PLOS ONE*, *15*(6), e0234012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234012>

- Paterson, K., Zanivan, S., Glasspool, R., Coffelt, S. B., & Zagnoni, M. (2021). Microfluidic technologies for immunotherapy studies on solid tumours. *Lab on a Chip*, *21*(12), 2306–2329. <https://doi.org/10.1039/D0LC01305F>
- Rodrigues, J., Sarmiento, B., & Pereira, C. L. (2022). Osteosarcoma tumor microenvironment: the key for the successful development of biologically relevant 3D *in vitro* models. *In vitro Models*, *1*(1), 5–27. <https://doi.org/10.1007/s44164-022-00008-x>
- Samadian, H., Jafari, S., Sepand, M. R., Alaei, L., Sadegh Malvajerd, S., Jaymand, M., Ghobadinezhad, F., Jahanshahi, F., Hamblin, M. R., Derakhshankhah, H., & Izadi, Z. (2021). 3D bioprinting technology to mimic the tumor microenvironment: tumor-on-a-chip concept. *Materials Today Advances*, *12*, 100160. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2021.100160>
- Sleeboom, J. J. F. (2020). *Microfluidic models of metastasis: in vitro approaches to study the microenvironment*. [Doctoral dissertation, Technische Universiteit Eindhoven.] <https://research.tue.nl/en/publications/microfluidic-models-of-metastasis-in-vitro-approaches-to-study-th>
- Wang, J., Tregrosa-Allen, S., Elzey, B. D., Utturkar, S., Lanman, N. A., Bernal-Crespo, V., Behymer, M. M., Knipp, G. T., Yun, Y., Veronesi, M. C., Sinn, A. L., Pollok, K. E., Brutkiewicz, R. R., Nevel, K. S., & Matosevic, S. (2021). Multispecific targeting of glioblastoma with tumor microenvironment-responsive multifunctional engineered NK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(45). <https://doi.org/10.1073/pnas.2107507118>
- YAN, W., ZHANG, Q., CHEN, B., LIANG, G.-T., LI, W.-X., ZHOU, X.-M., & LIU, D.-Y. (2013). Study on Microenvironment Acidification by Microfluidic Chip with Multilayer-paper Supported Breast Cancer Tissue. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, *41*(6), 822–827. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60661-1](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60661-1)
- Yankaskas, C. L., Bera, K., Stoletov, K., Serra, S. A., Carrillo-Garcia, J., Tuntithavornwat, S., Mistriotis, P., Lewis, J. D., Valverde, M. A., & Konstantopoulos, K. (2021). The fluid shear stress sensor TRPM7 regulates tumor cell intravasation. *Science Advances*, *7*(28). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh3457>
- Zheng, L., Wang, B., Sun, Y., Dai, B., Fu, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Yang, Z., Sun, Z., Zhuang, S., & Zhang, D. (2021). An Oxygen-Concentration-Controllable Multiorgan Microfluidic Platform for Studying Hypoxia-Induced Lung Cancer-Liver Metastasis and Screening Drugs. *ACS Sensors*, *6*(3), 823–832. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01846>

Zhu, L., Shao, C., Chen, H., Chen, Z., & Zhao, Y. (2021). Hierarchical Hydrogels with Ordered Micro-Nano Structures for Cancer-on-a-Chip Construction. *Research*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.34133/2021/9845679>