

## CHẾ TẠO HỆ VI GIẾNG ĐỂ NUÔI CÂY KHỐI U DẠNG 3D

Đến tòa soạn 20-12-2019

Lê Trường Giang, Nguyễn Thành Dương

Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### SUMMARY

#### FABRICATION OF MICROWELLS FOR CULTURING 3D CANCER SPHEROID

*Cancer is the leading cause of death worldwide and current therapies do not dramatically increase the poor prognosis. In vitro models based on two-dimensional (2D) monolayer culture have been used to study cancer behavior but shown limited. In vitro 3D tumor models contribute a promising platform of disease that mimics in vivo behaviors of tumor cells to develop potential cancer therapies. In this study, we fabricated microwells from simple and cheap material PEG for the control of in vitro 3D culture by using photolithography technique.*

**Keywords:** PEGDA, microwells, photolithography

#### 1. MỞ ĐẦU

Ung thư hiện nay đã gây ra khoảng 8,2 triệu ca tử vong mỗi năm trên toàn thế giới [1]. Trong các phương pháp điều trị ung thư hiện nay, hoá trị vẫn đang được ứng dụng rộng rãi nhất [2]. Tuy nhiên, số lượng các thuốc điều trị ung thư vẫn còn rất hạn chế do các trở ngại về thử nghiệm trong nghiên cứu trong đó thiếu các mô hình thử nghiệm tin cậy là nguyên nhân chính [3].

Mô hình thử nghiệm thuốc hiện tại chủ yếu dựa trên kỹ thuật nuôi cấy tế bào dạng đơn lớp (2D) [4]. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu thử nghiệm thuốc trên mô hình này thường khá khác biệt với các thử nghiệm trên động vật (*in vivo*) do môi trường vi mô bị thay đổi, tương tác giữa tế bào với tế bào và tế bào ma trận ngoại bào, làm hạn chế việc ứng dụng mô hình để nghiên cứu chức năng cụ thể của mô tế bào [5,6]. Do đó, cần có những phương pháp hiệu quả hơn để cải thiện những nhược điểm mà mô hình truyền thống 2D gặp phải và mô hình 3D

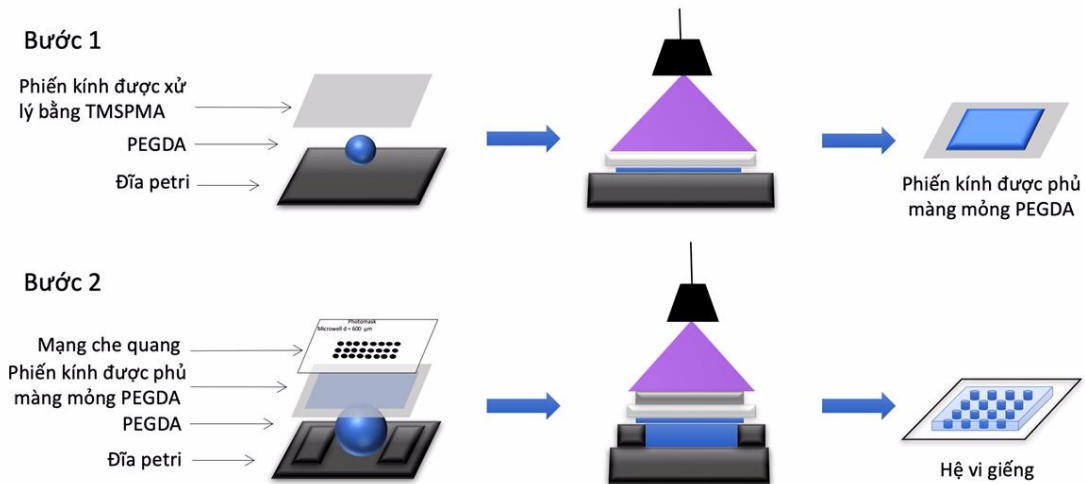
chính là giải pháp hữu hiệu để có thể giải quyết các hạn chế được phân tích như trên.

Trong những năm gần đây, có nhiều phương pháp đã được sử dụng để chế tạo khối u dạng 3D như well-plate, hoặc một vài loại cấu trúc khung và vật liệu nền như collagen, hạt nano polyme 3D, khung xốp được chế tạo từ poly(lactide-co-glycolide)... [7,8]. Trong đó, tạo khối u dạng 3D bằng phương pháp nuôi cấy trong hệ vi giếng đem lại nhiều kết quả đáng tin cậy đó là phương pháp dễ thực hiện, chi phí thấp cũng như thuận tiện trong việc chế tạo.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chế tạo hệ vi giếng ứng dụng trong nuôi cấy tế bào dạng 3D. Mô hình này sẽ có những ứng dụng thực tiễn để làm cầu nối giữa các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo*. Đồng thời nghiên cứu sẽ góp phần rút ngắn được thời gian nghiên cứu về khối u, ứng dụng trong công nghệ tế bào gốc, sinh học tế bào và nghiên cứu thuốc.

#### 2. THỰC NGHIỆM

##### 2.1. Nguyên liệu



Hình 1: Sơ đồ quy trình tạo khối u nhân tạo dạng 3D. Quy trình gồm 3 bước: bước 1, phủ lớp mỏng PEGDA lên phiến kính; bước 2, tạo hệ vi giếng bằng phương pháp quang hoá dựa theo mạng che quang được thiết kế bằng phần mềm AutoCAD.

Poly(ethylene glycol) dimethyl acrylate (PEGDA) (MW 700 Da), 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate 98% (TMSPMA), 2-hydroxy-2-methyl propiophenone photoinitiator (PI) được sản xuất bởi Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO).

## 2.2. Xử lý bề mặt phiến kính

Phiến kính (kích thước 18x18 mm của hãng Corning Incorporated) được xử lý bề mặt bằng 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate 98% (TMSPMA) với mục đích giúp PEGDA kết dính tốt hơn với phiến kính. Để xử lý bề mặt phiến kính bằng TMSPMA đạt hiệu quả tốt nhất, phiến kính đầu tiên được xử lý bằng NaOH bằng cách ngâm qua đêm trong dung dịch NaOH 10%. Sau đó, các phiến kính này được rửa sạch bằng nước cất và cồn 100% trước khi đem làm khô tự nhiên trong tủ hút. Sau khi làm khô, phiến kính được nhò TMSPMA lên bề mặt và sấy ở nhiệt độ 80°C qua đêm. Làm sạch lại sản phẩm thu được bằng nước cất và cồn 100%. Cuối cùng, phiến kính được chiếu UV trước khi đem sử dụng.

## 2.3. Chế tạo hệ vi giếng

Các vi giếng được chế tạo theo sơ đồ ở Hình 1. Hòa tan PEGDA được hoà tan trong dung dịch đệm PBS với nồng độ từ 10 tới 80% (w/w) và được chuẩn bị mới cho mỗi lần thí nghiệm. PI được hoà tan trong dung dịch PEGDA với nồng độ 0.05% (w/w). Dung dịch được khuấy đều trước khi tiến hành trùng hợp. Trùng hợp hydrogel theo cơ chế quang hoá được tiến hành bởi đèn Omnicure S2000 (320-500 nm, EXFO, Ontario, Canada) với công suất 100 mW/Cm<sup>2</sup> (đo ở bước sóng 365 nm) để đóng rắn hydrogel. Bề mặt phiến kính được phủ lớp PEGDA hydrogel mỏng để ngăn chặn sự tương tác của tế bào với bề mặt thuỷ tinh bên dưới. Để tạo lớp hydrogel mỏng này, nhò 0 µL dung dịch PEGDA lên bề mặt phiến kính và chiếu tia cực tím trong 30 giây ở khoảng cách cố định là 15 cm. Sau đó, nhò 50 đến 100 µL dung dịch PEGDA hydrogel lên đĩa petri và phiến kính sau khi được phủ lên lớp dung dịch hydrogel này. Các mạng che quang được thiết kế bằng phần mềm AutoCAD, in và đặt lên phía trên phiến kính. Tia cực tím được chiếu phía trên mạng che quang để tạo ra hệ vi giếng. Thời gian chiếu tia UV được khảo sát để tìm điều kiện tối ưu tạo ra hệ vi giếng.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của nồng độ PEGDA tới độ bền hệ vi giếng

Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của nồng độ PEGDA tới độ bền của hệ vi giếng, lần lượt ở các nồng độ 10%, 20%, 40%, 80% của PEGDA-700 được chuẩn bị và tiến hành tạo hydrogel. Các loại hydrogel PEGDA trong khảo sát này đều được đánh giá độ ổn định trên bề mặt phiến kính đã được phủ TMSPMA. Tất

cả các hydrogel có hàm lượng 80% PEGDA-700 bị phân tách khỏi phiến kính vào ngày thứ 2 và ở hàm lượng 60% PEGDA-700 bị phân tách vào ngày thứ 11. Tuy nhiên, ở các nồng độ 10%, 20% và 40% của PEGDA-700 vẫn được ghi nhận là ổn định trong 21 ngày. Từ các kết quả trên có thể thấy được việc sử dụng PEGDA-700 nồng độ thấp hơn hoặc bằng 40% cho độ bền của hệ vi giếng phù hợp với thời gian nuôi cấy khối u dạng 3D.

*Bảng 1. Tối ưu hóa thời gian chiếu tia UV cho PEGDA-700. Tùy thuộc vào nồng độ, thời gian chiếu tia UV cho PEGDA-700 có sự khác nhau. (A) PEGDA-700 với nồng độ 10% tiếp xúc với tia UV từ 80 đến 140 giây. (B) 20% lượng hydrogel PEGDA-700, 200-600 mm tiếp xúc với tia UV từ 45 đến 95 giây. (C) 40% PEGDA-700 được xử lý bằng UV bắt đầu từ 10 giây đến 35 giây.*

**PEGDA 750, nồng độ 10%**

Thời gian (giây) \ Kích thước vi giếng (um)	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140
200	Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng										
400						Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng					
600											Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng

**PEGDA 750, nồng độ 20%**

Thời gian (giây) \ Kích thước vi giếng (um)	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105
200		Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng									
400						Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng					
600										Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng	

**PEGDA 750, nồng độ 40%**

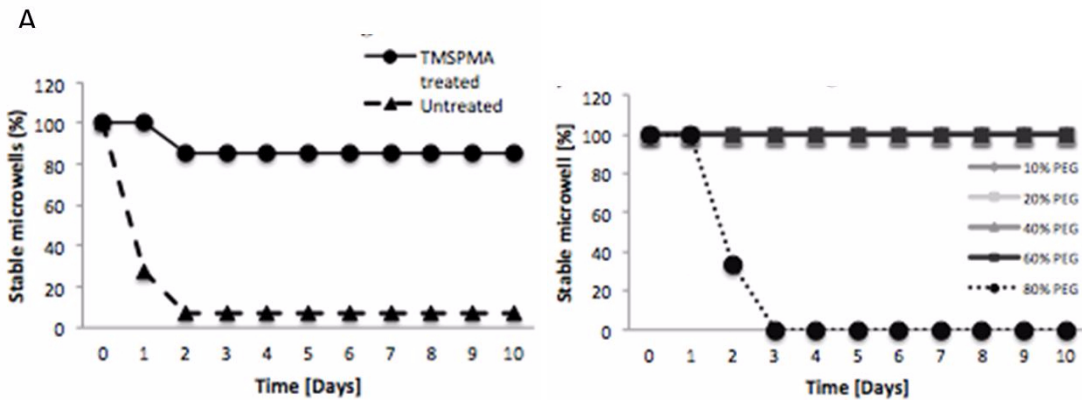
Thời gian (giây) \ Kích thước vi giếng (um)	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
200	Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng										
400					Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng						
600											Chưa đóng rắn	✓	Bị lấp giếng

Để tiếp tục tối ưu hoá nồng độ hydrogel PEGDA-700, chúng tôi đã so sánh kích thước của vi giếng được chế tạo dưới các nồng độ 10%, 20% và 40% PEGDA-700. Kết quả thu được cho thấy khi nồng độ PEGDA-700 là 10%, 20% và 40% thì thời gian phơi sáng UV tối ưu lần lượt là 85, 55 và 12 giây để có thể đạt được độ chính xác của vi giếng có kích thước 200  $\mu\text{m}$ ; 110, 75 và 20 giây để có thể đạt được độ chính xác vi giếng 400  $\mu\text{m}$  và cuối cùng là 135, 95 và 32 giây đủ để đạt độ chính xác của vi giếng kích thước 600  $\mu\text{m}$  (Bảng 1). Thời gian tiếp xúc với UV để hình thành vi giếng có thể thay đổi phụ thuộc vào nồng độ PEGDA-700. Tuy nhiên, chúng tôi hạn chế việc tiếp xúc với UV để tiết kiệm thời gian và hiệu quả của việc chế tạo. Do đó, ở điều kiện 40% PEGDA-700 mang lại thời gian trùng hợp

chính xác được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2. Ảnh hưởng của xử lý bề mặt tới độ bền hệ vi giếng

Các vi giếng sau khi chế tạo được tiến hành đánh giá độ ổn định trước khi tiến hành quá trình nuôi cấy tế bào trong 21 ngày. Độ ổn định của các vi giếng PEGDA bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau, chẳng hạn như sự biến tính bề mặt phiến kính (bề mặt phiến kính đã và chưa xử lý với TMSPMA). Kết quả thu được chỉ ra rằng phiến kính được xử lý bề mặt với TMSPMA có kết quả ổn định hơn so với phiến kính không được xử lý bề mặt ở bất kỳ trọng lượng phân tử PEGDA. Chỉ duy nhất 7% của cả hydrogel PEGDA-700 vẫn ổn định trong 21 ngày khi bề mặt kính không được xử lý TMSPMA.



Hình 2: Tính ổn định của PEGDA hydrogel trên kính che được xử lý và không được xử lý. (A) Tỷ lệ phần trăm vi sóng ổn định được chuẩn bị bởi PEGDA-700 trên phiến kính được xử lý và không được xử lý TMSPMA. Kết quả cho thấy kính che được xử lý bằng TMSPMA dẫn đến sự gắn kết hydrogel ổn định so với kính che không được xử lý. (B) Nồng độ khác nhau (10% đến 80%) của PEGDA-700 đã được điều chế và áp dụng trên kính che được xử lý TMSPMA.

## 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chế tạo được hệ vi giếng từ PEGDA. Một loạt các vi giếng khác nhau về kích thước cũng như hình dạng đã được chế tạo bằng kỹ thuật khắc quang học. Trong tương lai gần, khối u nhân tạo dạng 3D sẽ được nuôi cấy trong thời gian dài với hiệu năng cao và kích thước của các khối u này

phụ thuộc vào kích thước của các vi giếng, việc chế tạo khối u 3D sẽ đóng vai trò như một mô hình *in vitro* đáng tin cậy có thể làm giảm thời gian nghiên cứu *in vivo* cho các nghiên cứu tăng trưởng khối u tiền lâm sàng.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài GUST.STS.ĐT2018-HH02

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Islamic F., Mallath M.K. and Jemal A., “Primary liver cancer deaths and related years of life lost attributable to hepatitis B and C viruses in India,” *Cancer Epidemiol.*, 40, pp 79–86 2016.
2. Sassier M., Dugué A.E., Clarisse B., Lesueur P., Avrillon V., Bizieux-Thaminy A., Auliac J.B., Kaluzinski L., Tillon J., Robinet G., Le Caer H., Monnet I., Madroszyk A., Boza G., Falchero L., Fournel P., Egenod T., Toffart A.C., Leiber N., Do P., and Gervais R., “Renal insufficiency is the leading cause of double maintenance (bevacizumab and pemetrexed) discontinuation for toxicity to advanced non-small cell lung cancer in real world setting,” *Lung Cancer*, 89, pp 161–166, 2015.
3. Celli JP, et al. 3D ovarian cancer models: imaging and therapeutic combinations. SPIE Photonics West 2010.
4. Kunz-Schughart LA, Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int* 1999; 23(3):157-161.
5. Debnath J, et al. The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* 2002; 111(1):29-40.
6. Beningo KA, Dembo M, & Wang YL. Responses of fibroblasts to anchorage of dorsal extracellular matrix receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(52):18024-18029.
7. Zietarska M, et al. Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Molecular carcinogenesis* 2007; 46(10):872-885.
8. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988; 240(4849):177-184.