

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

Просекина Елизавета Андреевна

**Создание персонализированных клеточных систем на основе
тумороидов для оптимизации лекарственного лечения агрессивных
форм солидных опухолей**

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена в
Научном отделе онкоиммунологии
ФГБУ "НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова"
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
зав. научным отделом: д.м.н., в.н.с. Балдуева И.А.

Научный руководитель: к.б.н., доцент Спивак И.М.

Санкт-Петербург – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
Глава.1 Обзор литературы.....	7
СОЗДАНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ТРЕХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ПРИКЛАДНОЙ ОНКОЛОГИИ	7
1.1. Классификация опухолевых трёхмерных систем.....	7
1.2. История создания трёхмерных клеточных моделей	7
1.3. Строение и состав тумороидов	9
1.5. Кинетика роста тумороидов	12
1.5. Методы формирования тумороидов	14
1.5.1. Технология висячих капель (Hanging drop method)	14
1.5.2. Технология получения сфероидов на низкоадгезивных поверхностях	15
(Liquid overlay technique (LOT)).....	15
1.5.3. Технологии на основе непрерывного движения (Agitation-based technique).....	15
1.6. Скаффолдные технологии	16
1.6.1. Скаффолды, полученные из природных полимеров.....	16
1.6.2. Скаффолды, полученные из синтезированных полимеров	18
1.7. Применение трехмерных клеточных моделей для решения задач теоретической и практической медицины	19
1.8. Заключение.....	25
ГЛАВА 2. Материалы и методы	27
2.1. Культивирование опухолевых клеток в монослое	30
2.1.1. Криоконсервация опухолевых клеток.....	31
2.1.2. Разморозка опухолевых клеток.....	31
2.2. Культивирование опухолевых клеток в тумороидах	31
2.2.1. Метод висячей капли – Hanging drop method	31
2.2.2. Технология получения сфероидов на низкоадгезивных поверхностях – Liquid overlay technique.....	31
2.3. Конфокальная микроскопия.....	32
2.4. Иммуногисто-/цитохимический анализ	32
2.4.1. Подготовка образцов.....	32
2.4.2. Иммуногисто-/цитохимический метод выявления антигенов	33
2.5. Анализ продукции альдегиддегидрогеназы (ALDH) с помощью проточной цитофлуорометрии	34
2.6. Иммуноферментный анализ (ИФА).....	35
2.7. Мультиплексный анализ.....	36
2.8. Исследование цитотоксического действия химиопрепаратов на монослойные культуры и сфероиды.....	37
2.8.1. МТТ-тест	38
2.9. Исследование инвазивных свойств тумороидов в матрикеле с помощью автоматической аналитической системы Cell-IQ.....	39
2.10. Статистическая обработка данных	40
3.1. Морфологические характеристики опухолевых культур.....	41
3.3. Визуализация структурных особенностей тумороидов с помощью конфокальной микроскопии	46

3.4. Иммуногисто-/цитохимическое исследование опухолюидов.....	48
3.5. Сравнительная оценка альдегиддегидрогеназной активности в 2D- и 3D-системах с помощью проточной цитофлуориметрии	53
3.6. Оценка продукции цитокинов и хемокинов 2D- и 3D-системами с помощью мультиплексного анализа	54
3.7. Иммуноферментный анализ продукции иммуносупрессирующих факторов МІСА и TGF- β 2D- и 3D-клеточными системами	56
3.8. Оценка цитотоксического действия химиопрепаратов на 2D- и 3D-системы с помощью МТТ-теста	58
3.9. Исследование инвазивных свойств опухолюидов в матригеле под влиянием цитостатиков с помощью автоматической аналитической системы Cell-IQ.....	64
ОБСУЖДЕНИЕ	77
ВЫВОДЫ	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ALDH – Aldehyde dehydrogenase
BME – Basement membrane extract
CSCs – Cancer stem cells
ДМСО (DMSO) – диметилсульфоксид (dimethyl sulfoxide)
E-cadh (CD324) – E-cadherin
ECM – Extracellular matrix
EGF – Epidermal Growth Factor
FAK – Focal Adhesion Kinase
FBS – Fetal Bovine Serum
FCS – Fetal Calf Serum
FGF – Fibroblast growth factor
GLUT1 – Glucose transporter-1
HIF-1 – Hypoxia-inducible factor-1
HTS – High-throughput screening
IGF – Insulin-like growth factors
ITS – Insulin-Transferrin-Selenium
LOT – Liquid overlay technique
MCS – Multicellular spheroid
MCTS – Multicellular tumor spheroid
MHC – Major histocompatibility complex
MMP – Matrix Metalloproteinases
MSC – Mesenchymal stem cells
OMSs – Organotypic multicellular spheroids
PDGF – Platelet-derived growth factor
PEG – Poly(ethylene glycol)
PI – Propidium iodide
PLG – Poly(lactic-co-glycolic
PNIPAM – Poly(N-isopropylacrylamide)
SA-PE – Streptavidin-Phycoerythrin
TDTs – Tissue-derived tumor spheres
TGF- β – Transforming growth factor beta
TNF- α – Tumor Necrosis Factor Alpha
АТФ – Аденозинтрифосфат
МСК – Мезенхимальные стволовые клетки
ППС – Полная питательная среда
ФДТ – Фотодинамическая терапия

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественная опухоль представляет собой сложно организованную в пространстве многокомпонентную систему, которая имеет индивидуальные особенности для каждого пациента. Как правило, злокачественное новообразование характеризуется структурной и популяционной гетерогенностью, физиологически значимыми взаимодействиями «клетка-клетка» и «клетка-матрикс», наличием градиентов веществ, атипичным микроокружением. Адекватные модельные системы должны отражать анатомическую и физиологическую сложность злокачественного новообразования, влияющую на распределение клеточных рецепторов и различных веществ, в том числе молекул лекарственных препаратов

Самыми распространенными клеточными моделями *in vitro* в течение многих десятилетий были двухмерные (монослойные) культуры, *in vivo* - животные модели. Однако эти модели имеют ряд недостатков. В частности, двухмерные модели хорошо воспроизводимы, имеют низкую стоимость в содержании, но практически не сохраняют фенотипическое сходство с опухолевым материалом, из которого они были получены. Животные модели отлично имитируют сложное трёхмерное расположение клеток, градиент веществ, а также особенности опухолевого микроокружения, но они трудно воспроизводимы и дороги в содержании.

С точки зрения соотношения «преимуществ/недостатков» модельных характеристик, трёхмерные (3D-) клеточные структуры – сфероиды (тумороиды) могут служить микромоделью, отражающей основные особенности опухоли пациента. Тумороиды максимально приближены по структуре и физиологическим свойствам к естественной опухолевой системе, хорошо воспроизводимы и недороги в поддержании.

Опухолевые сфероиды, полученные из клеточных линий злокачественных новообразований человека, наглядно показывают, что они являются приемлемой моделью для изучения микроэкологической регуляции физиологии опухолевых клеток и для решения проблем, связанных с метаболическими и пролиферативными градиентами в трехмерном культивировании при исследовании активности новых терапевтических препаратов (Rodríguez-Enríquez et al., 2008).

Создание трёхмерных клеточных моделей способствует изучению особенностей опухолевого микроокружения, более адекватной оценке терапевтического воздействия на малигнизированные клетки, что позволяет улучшить прогностическую ценность доклинических исследований и способствовать прогрессу эффективной лекарственной терапии злокачественных новообразований.

В данной работе были получены 3D-модели (тумороиды) из клеток солидных опухолей пациентов, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Была произведена оценка экспрессируемых цитокинов и хемокинов, изучен пролиферативный и инвазивный потенциал и установлена взаимосвязь между эффектом воздействия химиопрепаратов на тумороиды и клиническим ответом на лекарственное лечение у пациентов.

Целью исследования является разработка экспериментальных моделей опухолевого очага *in vitro* для создания персонализированного подхода в лечении злокачественных новообразований

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

- Выделить, культивировать клетки опухолей разного гистогенеза, полученных интраоперационно, создать и характеризовать трёхмерные структуры (тумороиды);
- Оценить пролиферативную и метаболическую активность опухолевых клеток в тумороидах;
- Сравнить секреторные способности опухолевых клеток в 2D- и 3D-системах культивирования;
- Изучить инвазивный потенциал опухолевых клеток в 3D-системе культивирования;
- Установить взаимосвязь между эффектом воздействия химиопрепаратов на тумороиды и клиническим ответом на лекарственное лечение у пациентов.

ГЛАВА.1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СОЗДАНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ТРЕХМЕРНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ПРИКЛАДНОЙ ОНКОЛОГИИ

1.1. Классификация опухолевых трёхмерных систем

Четкая терминологическая основа, описывающая процесс создания опухолевых 3D-моделей отсутствует, несмотря на то, что технологии получения тумороидов развиваются очень быстро. Таким образом, существуют различные названия трёхмерных систем, различные техники культивирования и их основные характеристики. Но все эти опухолевые сфероподобные структуры имеют общие черты: округлая форма, наличие злокачественных клеток и способность этих культур не адгезироваться на пластик.

По способам получения все сферические модели опухолей можно разделить на четыре группы (Weiswald et al., 2015):

- 1) **Многоклеточные опухолевые сфероиды** (*MCTS – Multicellular tumor spheroids*), образующиеся из одноклеточной суспензии в низкоадгезивных условиях;
- 2) **Тумосферы** (*tumorospheres*), культуры опухолевых стволовых клеток;
- 3) **Тканевые сфероиды** (*tissue-derived tumor spheres*), образующиеся после частичной диссоциации опухолевых тканей;
- 4) **Органотипические многоклеточные сфероиды** (*organotypic multicellular spheroids*), образующиеся из дезагрегированной опухолевой ткани в низкоадгезионных условиях.

В этом обзоре преимущественно будет сделан акцент на многоклеточные опухолевые сфероиды, или тумороиды.

1.2. История создания трёхмерных клеточных моделей

Трёхмерное культивирование впервые прослеживается в работах Alexis Carrel. В 1912 году А. Carrel вырастил эксплантант, полученный из эмбриона цыпленка, и поддерживал его жизнеспособность в течение 3-х месяцев (Carrel, 1912). J.A. Leighton усовершенствовал метод А. Carrel, культивируя ткани на субстрате (губчатой матрице) (Humphreys, 1963). В дальнейшем культивирование клеток происходило на различных матрицах, представляющих собой коллагеновые гели.

При изучении механизмов гаструляции эмбрионов амфибий J. Holtfreter исследовал

самоорганизацию эктодермальных, мезодермальных и энтодермальных зародышевых листков относительно друг друга в клеточные форменные агрегаты и сделал вывод, что клетки не просто объединяются, а ещё и закономерно распределяются в пространстве относительно друг друга (Holtfreter, 1943).

А. Moscona в 1950-е г. продемонстрировал, что клетки, полученные из дезагрегированной ткани, способны затем снова образовывать клеточные агрегаты *in vitro* (Moscona and Moscona, 1952).

Более активно работы по получению многоклеточных опухолевых сфероидов начались в 70-е года прошлого века, когда эта клеточная модель была получена радиобиологами. R. Sutherland применил методику, разработанную А. Moscona и J. Holtfreter, для формирования опухолевых сфероидов из дезагрегированного материала путем вращения клеток в спиннерных колбах, и в дальнейшем совершенствовал модель, используя широкое разнообразие линий малигнизированных клеток (Sutherland and McCredie, 1971).

Первые работы по изучению образования клетками солидных опухолей тумороидов показали интересные результаты, указывающие на генетическое детерминирование злокачественных клеток в процессе опухолевой прогрессии. Так, в 1978 г. J. M. Yuhas и соавт. обнаружили, что из всех изученных клеточных линий рака молочной железы образовывали сфероиды те опухолевые клетки, которые были выделены из первичных и метастатических солидных очагов, в отличие от клеток из плеврального выпота и асцитической жидкости (Yuhas et al., 1978).

Спустя десятилетие группа R. Bjerkvig представила новую модель, получившую название органотипические многоклеточные сфероиды (OMS), которая легко получается при простой дезагрегации опухолевых тканей и культивировании полученного материала вместе с капиллярной системой в течение нескольких недель (Bjerkvig et al., 1990).

Интерес к трёхмерной культуре, или иначе её называли "гистокультуре", с годами возрос вместе с совершенствованием методов визуализации и анализа (Hirschhaeuser et al., 2010).

В 2000-е гг. для расширения познаний и изучения опухолевых стволовых клеток (CSCs) появилась новая трёхмерная опухолевая модель – тумосферы (*tumorospheres*). Это сферы, которые культивируют из стволовых опухолевых клеток. Способность этих клеток формировать не одну сферу, а несколько, свидетельствует о высоком метастатическом потенциале опухолевых стволовых клеток.

Совсем недавно появился новый вариант клеточной модели – тканевые сферы (*tissue-derived tumor spheres (TDTs)*). Эти модели интересны тем, что были получены

путем частичной диссоциации опухолевой ткани, позволяющей поддерживать клеточные контакты опухолевых клеток. Первоначально такие модели были получены для исследований, выполненных *in vitro* для линий клеток опухолей толстой кишки человека (Weiswald et al., 2009). Со временем такие модели опухолевых тканей были получены не только для колоректального рака, но и для рака легкого, мочевого пузыря, простаты, молочной железы и увеальной меланомы (Young et al., 2013).

1.3. Строение и состав опухолюидов

На сегодняшний день описаны способы получения и основные характеристики опухолюидов рака поджелудочной железы (Meier-Hubberten and Sanderson, 2019), рака молочной железы (Costa et al., 2014), рака шейки матки (Costa et al., 2014), колоректального рака (Courau et al., 2019), рака легкого (Amann et al., 2014) и др.

Размер опухолюидов может варьировать от 100 до 1000 мкм. Внутри опухолюидов диаметром более 400-500 мкм присутствует клеточная зональность, которая становится более выраженной с увеличением размера опухолюида. Ряд исследователей описывают наличие в опухолюидах нескольких слоёв (Mehta et al., 2012):

- Внешний (*proliferative*) – содержит преимущественно пролиферирующие и метаболически активные клетки;
- Средний (*quiescent*) – представлен покоящимися или стареющими клетками. Клетки имеют минимальную метаболическую активность, но становятся активными после поглощения питательных веществ;
- Внутренний (*necrotic*) – содержит преимущественно некротические и апоптотические клетки. Слой иначе называют некротическим ядром. Клетки теряют свою активность из-за недостатка питательных веществ и накопления продуктов метаболизма.

Опухлюиды особенно ценны при изучении проблем эффективности терапевтических агентов, связанных с метаболическими и пролиферативными градиентами, которые присутствуют в солидных опухолях *in vivo*. Крупные сфероиды (от 500 мкм) развивают центральный некроз и области гипоксии, которые характерны для первичного узла или метастатического очага больших размеров при многих онкологических заболеваниях.

Одной из важных характеристик сфероидов является предел диффузии – около 150-200 мкм для многих молекул (Lin and Chang, 2008). В результате этих ограничений по массовому транспорту у сфероидов, как правило, появляются градиенты кислорода, распределения питательных веществ, накопления метаболических отходов и профиля пролиферации внутри них, что имеет решающее значение для тестирования

противоопухолевых терапевтических средств (рис. 1).

Микросреда внутри опухоороида подкисляется (диапазон рН 6,5-7,2) за счёт того, что в гипоксических условиях опухолевые клетки активно преобразуют пируват в лактат (Alfarouk et al., 2014). Подобное явление называется эффектом Варбурга, оно связано с накоплением лактата в солидных опухолях (Kim and Dang, 2006; Trédan et al., 2007). Низкий уровень рН окружающей микросреды стимулирует клетки стареющей и некротической зон активно продуцировать факторы, которые способствуют усилению пролиферативной активности опухолевых клеток и их выживанию (Harris, 2002; Lv et al., 2017).

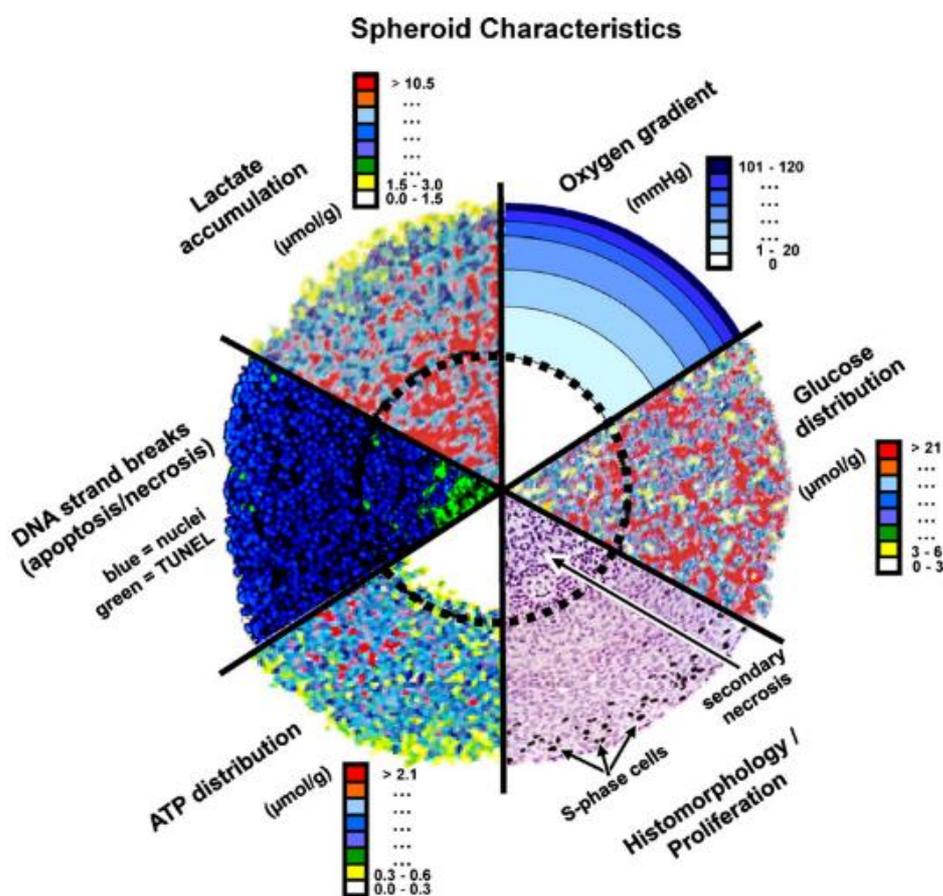


Рисунок 1. Градиент распределения веществ внутри опухоороида (Hirschhaeuser et al., 2010).

В частности, сверхэкспрессия индуцируемого гипоксией фактора-1 (HIF-1) регулирует большой набор генов, участвующих в васкуляризации опухоли, образовании метастазов, опухолевых стволовых клеток (CSCs), а также способствует выживанию опухолевых клеток в условиях гипоксии. В условиях длительной гипоксии достигается высокая концентрация активного димера HIF-1 α . Димер HIF-1 α перемещается в ядро, где

при взаимодействии с димером HIF-1 β активирует экспрессию более чем 200 генов, которые формируют устойчивость к ишемии и гипоксии, в том числе гена SLC2A1, ответственного за экспрессию GLUT-1 (Martin et al., 2017).

Другой подобный фактор, глюкозный транспортер-1 (GLUT-1) представляет собой однонаправленный мембрано-связанный белок-переносчик глюкозы, осуществляющий облегченный перенос глюкозы через плазматическую мембрану клетки. Экспрессия GLUT-1 характерна почти для всех типов клеток, существуют также тканеспецифичные изоформы. В нормальных клетках глюкоза преобразуется в пируват через гликолиз. Впоследствии пируват трансформируется в ацетил-КОА, который используется в качестве субстрата в митохондриях для генерации АТФ. В опухолевых же клетках происходит аэробный гликолиз, известный как эффект Варбурга. Гипоксия в опухолях – это главный фактор, регулирующий экспрессию GLUT-1.

К. Carvalho и соавт. (2011) проанализировали закономерности экспрессии GLUT-1 в опухолях различного гистогенеза и оценили его диагностическую ценность с помощью иммуногистохимии. Они показали, что GLUT-1 по-разному экспрессируется в различных типах опухолей: саркомы, лимфомы, меланомы не экспрессируют GLUT-1, тогда как аденокарциномы экспрессируют его (от 5 до 50%). По мнению авторов, отсутствие GLUT-1 в саркомах, меланомах, и лимфомах позволяет предположить, в переносе глюкозы участвуют другие транспортёры (Carvalho et al., 2011).

М. D'ura с соавт. (2019) проанализировали экспрессию GLUT-1 в меланомах. Его экспрессия была обнаружена в 69/225 случаев. Они заключили, что GLUT-1 может быть использован в качестве маркера при оценке биологической природы доброкачественных и злокачественных меланоцитарных поражений. Однако, несмотря на свою высокую специфичность, чувствительность этого маркера относительно низкая. Кроме того, повышенная экспрессия GLUT-1 коррелирует с более коротким периодом выживания (10-летняя выживаемость без рецидивов). Таким образом, GLUT-1 может рассматриваться в качестве прогностически неблагоприятного фактора (D'ura et al., 2019).

У. Morigi с соавт. (2019) разработали трехмерный метод культивирования стволовых клеток эндометриоидного рака с высокой альдегид-дегидрогеназной активностью (ALDH) из операционного опухолевого материала. Высокий уровень ALDH коррелировал с увеличением поглощения глюкозы, активацией гликолитического пути и повышенной экспрессией GLUT-1. Ингибирование GLUT-1 приводило к уменьшению количества клеток, демонстрирующих характеристики стволовых клеток опухоли. Они также показали, что поглощение глюкозы через GLUT-1 функционально важно для выживания опухолевых стволовых клеток эндометрия с высокой экспрессией ALDH. Торможение

функций GLUT-1 специфическим ингибитором BAY876 было ассоциировано с увеличением чувствительности клеток сфероидов к препарату паклитаксел и подавляло их инвазивные способности. Подобные результаты были получены и для мышинных моделей опухоли эндометрия *in vivo* (Mori et al., 2019).

1.5. Кинетика роста опухолюидов

Формирование опухолюидов включает как минимум три фазы: агрегация отдельных клеток, последующее уплотнение опухолюида и его рост (Enmon et al., 2001; Lin et al., 2006). Весомый вклад в образование сфероидов вносят $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегрины и E-кадгерин. Опухолевые клетки в опухолюидах активно секретируют и депонируют компоненты внеклеточного матрикса: фибронектин, протеогликаны, коллаген IV, ламинин и др. $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегрины отвечают за взаимодействие опухолевых клеток с межклеточным матриксом (ECM) (Miranti and Brugge, 2002).

В нормальных эпителиальных клетках E-кадгерин регулирует механизмы межклеточной адгезии, клеточной подвижности и пролиферации. Также он играет важную роль супрессора в процессах инвазии клеток.

E-кадгерин увеличивает плотность опухолюида и создает барьер для проникающих извне веществ за счёт увеличения плотности адгезионных контактов между опухолевыми клетками (Ivascu and Kubbies, 2007; Smyrek et al., 2019). Увеличение плотности контактов E-кадгерина было показано на модели опухолюидов, полученных из метастатической линии эпителиального рака молочной мыши (4T1), которые имитируют поздние стадии рака молочной железы человека (Smyrek et al., 2019). Вместе с актином E-кадгерин вовлечен в первые две фазы формирования опухолюида – агрегации и уплотнения. Микротрубочки и киназы фокальных контактов (ФАК) также вносят вклад в образование трёхмерных структур, они вовлечены в фазу пролиферации и роста опухолюида (Smyrek et al., 2019) (Рис. 1).

Понимание процессов экспрессии интегринальных и кадгеринальных рецепторов адгезии в опухолюидах важно для разработки и оценки эффектов противоопухолевых препаратов, так как молекулы адгезии сами по себе могут являться мишенями для противоопухолевой терапии (Tripathi et al., 2004). Помимо этого рецепторы адгезии могут быть мишенями для повышения чувствительности опухолевых клеток к терапевтическим антителам (Green et al., 2002).

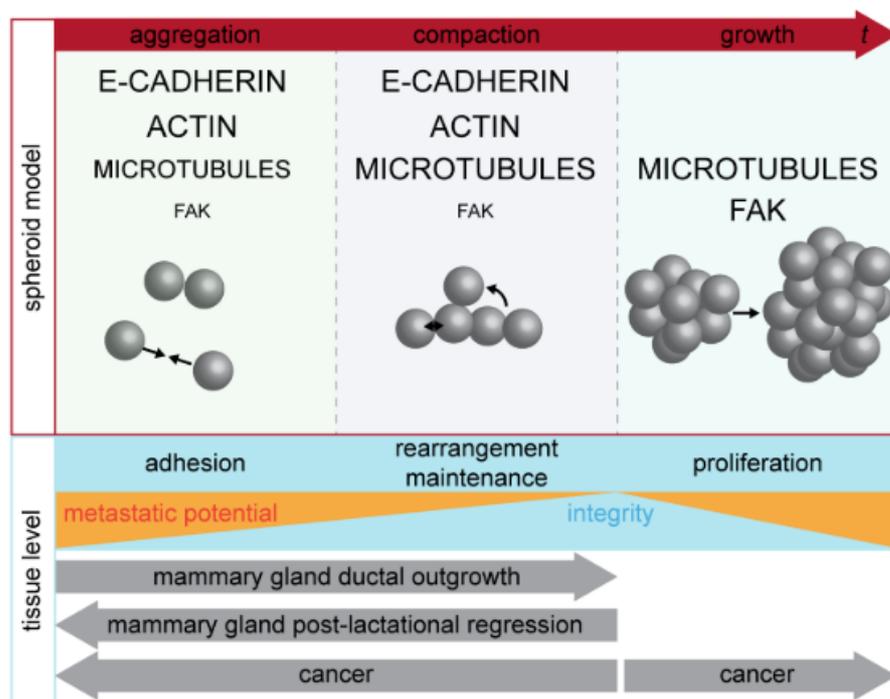


Рисунок 2. Модель роли внутриклеточных компонентов в формировании трёхмерных клеточных агрегатов (Smyrek et al., 2019).

Рядом исследователей был сделан вывод, что клетки, составляющие опухоид, сходны по морфологии, профилю продуцируемых веществ и по рецепторному составу с клетками злокачественных новообразований, развивающихся в живом организме (Chignola et al., 1999).

В опухоиде возможно генерировать не только гомотипические (гомосфероиды), но и гетеротипические взаимодействия (гетеросфероиды). Опуоиды возможно получать из различных типов опухолевых клеток в совокупности с клетками стромы, такими как фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки (MSCs), с клетками иммунной системы и с клетками эндотелия (Heimdal et al., 2001; Oudar, 2000; Rama-Esendagli et al., 2014; De Ridder et al., 2000). Кокультивирование такой системы в течение длительного периода приведет к продукции ростовых факторов, цитокинов, хемокинов и веществ внеклеточного матрикса (гликопротеины, протеогликаны, гиалуроновая кислота, коллаген и др.), что максимально приблизит модель к естественной системе, которую, в свою очередь, можно будет использовать для изучения эффектов воздействия противоопухолевых препаратов на опухолевые и нормальные клетки.

А. D. Conger и М.С. Ziskin (1983) провели сравнительный анализ роста 15 образцов сфероидов и опухолей, являющихся источником клеток для трехмерного моделирования, и пришли к выводу, что можно выделить три стадии роста сфероидов: экспоненциальную,

линейную и плато (Ziskin, 1983).

Действительно, рост тумороидов *in vitro* сходен с ростом солидных опухолей *in vivo*. В целом, процесс формирования солидных опухолей состоит из трёх основных фаз:

- Аваскулярная фаза, в которой происходит увеличение объёма опухолевой массы в геометрической прогрессии. При этом опухоль локализована и питательные вещества потребляются из близлежащих тканей;
- Сосудистая фаза, в которой происходит образование новых сосудов под действием ангиогенных факторов – ангиогенина, сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и др. (Menakuru et al., 2008);
- Метастазирование – фаза, в которой опухолевые клетки приобретают способность к миграции и инвазии. Под действием матриксных металлопротеиназ (ММП-2, ММП-9) происходит ремоделирование внеклеточного матрикса, что дает возможность опухолевым клеткам инвазировать и метастазировать (Van Dijk et al., 2013).

Клеточный объём тумороидов увеличивается экспоненциально до достижения определенного размера в диаметре (обычно от 500 до 1000 мкм), затем скорость роста уменьшается и выходит на плато. Подобная кинетика роста соответствует аваскулярной фазе роста солидных опухолей (Byrne, 2010; Costa et al., 2014).

1.5. Методы формирования тумороидов

Формирование сфероидов – спонтанный процесс, в котором взаимодействие «клетка-клетка» доминирует над взаимодействием «клетка-субстрат». Иначе говоря, нельзя позволить клеткам прикрепиться к культуральной посуде. Эффективность формирования сфероидов зависит от различных критериев, таких как стартовая посевная концентрация, длительность культивирования, наличие в среде помимо опухолевых клеток стромальных клеток, качество культуральной посуды, материалов и оборудования.

В целом, выделяют два основных способа получения сфероидов – бескафолдные технологии (*scaffold-free*) и технологии с использованием скаффолдов, иначе говоря, матриц-носительниц (*scaffold-based*).

Бескафолдные методы основаны на формировании сфероидов в неадгезивных условиях (Costa et al., 2016).

1.5.1. Технология висячих капель (Hanging drop method)

Данная технология висячих капель (*hanging drop method*) представляет собой капли клеточной суспензии, висящие на нижней стороне крышки чашки Петри и удерживающиеся на месте благодаря поверхностному натяжению. Под действием сил

гравитации клетки спонтанно соединяются в один кластер, который затем становится сфероидом. Так как этот метод также основан на естественной склонности клеток прилипать друг к другу, отсутствуют токсические эффекты, которые могут появляться из-за адгезии клеток к матрицам-носительницам в методах с использованием скаффолдов. Главным недостатком метода является ограниченный объем капли жидкости, содержащей клетки. Обычно капли вмещают максимальный объем до 50 мкл. Капли большего объема не удерживаются на поверхности культуральной посуды за счёт сил поверхностного натяжения.

Hanging drop method, несмотря на свою простоту, высокую воспроизводимость и возможность контроля определенного размера сфероида, является чрезвычайно трудоёмким. Поддержание сфероидов в капельках в подвешенном состоянии и регулярная смена среды отнимают много времени (Breslin and O'Driscoll, 2013).

1.5.2. Технология получения сфероидов на низкоадгезивных поверхностях (Liquid overlay technique (LOT))

Данный метод использует низкоадгезивные поверхности, сформированные полимерами, например, агаром, агарозой или гиалуроновой кислотой (Costa et al., 2014). Такие поверхности имеют важное свойство – супергидрофильность. Поэтому межклеточные взаимодействия начинают преобладать над взаимодействиями между клетками и поверхностью. Сфероиды на таких поверхностях формируются в течение трёх суток и сохраняют особенности солидных опухолей, из которых они были получены. В. Mayer и соавт. (2001) продемонстрировали, что 12 из 17 линий клеток рака желудка, культивированных с помощью LOT, способны имитировать особенности опухоли пациентов (Mayer et al., 2001). Использование низкоадгезионных поверхностей в формировании сфероидов является простым и недорогим методом, который позволяет получать множество сфероидов, что имеет решающее значение для высокопроизводительного скрининга (High-throughput screening (HTS)) лекарственных препаратов.

1.5.3. Технологии на основе непрерывного движения (Agitation-based technique)

Технология Agitation-based (*spinner flasks and rotating system*) представляет собой динамически вращающуюся систему биореакторов, предотвращающую адгезию клеток на поверхности культуральной посуды с помощью непрерывного перемешивания. В условиях непрерывного перемешивания клетки спонтанно агрегируются в сфероиды. Биореакторная технология позволяет производить большое количество сфероидов

одновременно, осуществлять постоянный динамический контроль за культуральными условиями (рН, концентрация питательных веществ, глюкоза и насыщение кислородом). Недостатки технологии – высокая стоимость специализированного оборудования, невозможность регулировать размер, форму сфероидов и их количество, отсутствуют индивидуальные условия для формирования сфероидов, наблюдающиеся в культуральных планшетах как в технологии LOT. (Benien and Swami, 2014; Costa et al., 2014).

Для предотвращения клеточной адгезии опухолевых клеток к пластику можно предварительно обрабатывать культуру клеток циклическими пептидами (cyclo-RGDfK(TPP)). Эти пептиды имитируют белки ЕСМ, связываясь с $\alpha 5\beta 1$ -интегринами на клеточной мембране. Взаимодействие циклических пептидов и $\alpha 5\beta 1$ -интегринов индуцируют экспрессию E-кадгеринов, которые способствуют образованию плотных контактов между клетками внутри сфероида (Haq et al., 2017).

1.6. Скаффолдные технологии

Скаффолды – это матрицы, представляющие собой сплошные губки или пены, гидрогели, волокна или бусины, изготовленные с различной пористостью и механическими характеристиками для имитации ЕСМ опухолей *in vivo*. Клетки, посаженные на поверхность или внутрь скаффолда, прикрепляются к матрице, а затем мигрируют внутрь структуры, образуя микроткань в пересечениях матрицы (Rimann and Graf-Hausner, 2012). Скаффолды делят на две большие группы в зависимости от происхождения полимеров, из которых они изготовлены.

1.6.1. Скаффолды, полученные из природных полимеров

Природные полимеры обладают высокой биосовместимостью. Внеклеточный матрикс за счёт обилия продуцируемых белков создаёт благоприятные условия для пролиферации клеток. В частности для культивирования мультиклеточных опухолевых сфероидов используют природные скаффолды из гидрогелей, таких как коллаген, matrigel и хитозан (Cui et al., 2017).

Коллаген является основным структурным белком в тканях человека, в связи с чем его часто используют в качестве матрикса благодаря наличию в нем интегриновых сайтов связывания. Его трёхмерная гидрогелевая пористая структура обеспечивает достаточный обмен кислорода, метаболитических продуктов и питательных веществ. За счёт ферментативных реакций (действия лизоцимом) коллаген подвергается диссоциации, что позволяет с легкостью извлекать сформированные сфероиды (Themistocleous et al., 2004).

Еще один природный полимер, Matrigel (*Basement Membrane Extract*), белковый

экстракт, был получен из секрета клеток Engelbreth-Holm-Swarm саркомы мыши (Benton et al., 2014). Его состав, определенный с помощью глубокого протеономического анализа включает основные компоненты, такие как ламинин (60%), коллаген IV (30%), нидоген и протеогликан гепарансульфат, которые обеспечивают как структурные, так и сигнальные функции. При деградации matrigel под действием опухолевых клеток эти факторы высвобождаются и повышают их способность к пролиферации и миграции. Компоненты ламинин и коллаген IV выполняют множество функций, в том числе способствуют адгезии и миграции клеток с помощью рецепторов адгезии на поверхности клеток. Нидоген, взаимодействуя с ламинином и коллагеном IV, способствует структурной организации этих внеклеточных молекул матрикса. Помимо основных компонентов было выявлено несколько факторов роста, в том числе FGF, EGF, TGF-beta, IGF, PDGF, активатор плазминогена ткани и другие факторы роста. Селективное удаление этих факторов роста из matrigel показала их функциональную значимость для различных типов клеток (Benton et al., 2014). В состав matrigel входят также остаточные матричные металлопротеиназы (ММП), получаемые из опухолевых клеток Engelbreth-Holm-Swarm саркомы мыши.

Таким образом, matrigel представляет из себя природный скаффолд, который часто используют в исследованиях взаимодействий клеток и внеклеточного матрикса. Нормальные эндотелиальные или эпителиальные клетки, нанесенные на matrigel и культивированные в стандартных условиях, проявили потенцию к высокоспецифичной дифференцировке и умеренной пролиферации. Было показано, что эндотелиальные клетки хорошо прилипают к матрице, в течение 12 часов мигрируют и формируют капиллярноподобные трубки, в то время как эпителиальные клетки молочной железы прилипают и формируют ацинарноподобные структуры, которые продуцируют молочный белок (Ghajar and Bissell, 2008; Arnaoutova et al., 2009).

G. Benton и соавт. (2009) продемонстрировали, что опухолевые клетки с высоким и низким метастатическим потенциалом росли со сходными темпами на пластике и проявляли схожую морфологию, однако на matrigel злокачественные клетки с высоким метастатическим потенциалом образовывали разветвленные и инвазивные структуры, в то время как клетки с низким инвазивным потенциалом собирались в небольшие агрегаты, при этом их инвазивный потенциал коррелировал с метастатической способностью клеток *in vivo* (Benton et al., 2009).

S. Konstantinovskiy и соавт. (2012) показали, что клеточные линии MCF10A и MDA-MB-231 отличаются по экспрессии E-кадгерина, белка цитоскелета эрзина, BCAR1/p130Cas, адаптерного белка, способствующего регулированию различных

сигнальных путей, ведущих к адгезии клеток, их миграции, инвазии, апоптозу. Эти клеточные линии различно формировали сфероиды и в 3D культурах на Matrigel проявляли различный инвазивный потенциал, что позволило сделать вывод о роли изучаемых белков в опухолевой прогрессии при карциноме молочной железы (Konstantinovsky et al., 2012).

Для культивирования тумороидов также исследованы природные полимеры, такие как агар для клеток рака яичников (Nath and Devi, 2016), фибрин (Liu et al., 2012) и белок фиброина шелка для клеток B16-F1 и линии рака молочной железы MDA-MB-231 (Talukdar and Kundu, 2012).

1.6.2. Скаффолды, полученные из синтезированных полимеров

Выделяют несколько основных типов синтетических материалов для создания скаффолдов, таких как полиэтиленгликоль, поли(лактид-ко-гликолид), поли(N-изопропилакриламид) (Cui et al., 2017). Эти полимеры возможно сочетать с другими мономерами, и тогда полученные сополимеры смогут вмещать различные типы клеток, способствовать пролиферации и агрегации клеток, а также поддерживать функциональность тканей.

Скаффолды, синтезированные искусственно, дают возможность их ручного редактирования, что позволяет модифицировать полученные конструкции для воспроизведения структурной сложности среды *in vitro*. В отличие от природных полимеров синтезированные скаффолды могут быть модифицированы для получения желаемых характеристик ЕСМ с целью повышения адгезионных свойств исследуемых клеток и поддержания функциональных свойств тканей (Liu and Vunjak-Novakovic, 2016).

Полиэтиленгликоль (PEG) является одним из наиболее популярных синтетических полимеров для культивирования в трехмерных условиях благодаря своей низкой токсичности и иммуногенности. PEG могут смешивать с полиэтилен оксидом (PEO) для образования сополимера, который будет обеспечивать улучшение характеристик PEG (Lee et al., 2015).

Полилактид-ко-гликолид (poly(lactic-co-glycolic) (PLG)) – синтетический скаффолд, ключевой компонент которого извлекается из природных метаболитов и обладает отличной биосовместимостью. Существует в различных формах, таких как пена, волокна, губки. Для культивирования гепатоцитарных сфероидов были разработаны пористые PLG-микросферы (Chou et al., 2013). При такой структуре ускорялось образование мультিকлеточных сфероидов, а пористость увеличивала прилипание клеток к полимеру и транспортировку питательных веществ, кислорода и отходов. S.P. Pathi и соавт. (2010)

смешивали PLG с гидроксиапатитом для воссоздания костоподобной среды для культуры сфероидов рака молочной железы. Эта смесь способствовала пролиферации и агрегации клеток рака молочной железы, поскольку гидроксиапатит стимулировал метастатический потенциал клеток карциномы молочной железы и стимулировала секрецию IL-8 (Pathi et al., 2010).

Поли(N-изопропилакриламид) (PNIPAM) гидрогель – это ещё один полимер с низкой токсичностью. PNIPAM использовали для культивирования мультিকлеточных сфероидов из клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, и было обнаружено, что в этом гидрогеле наблюдается более активная пролиферация клеток и образование сфероидов (Gu et al., 2015). Сополимеризация PNIPAM с 1% акриловой кислотой приводила к дальнейшему увеличению пролиферативной активности клеток HepG2 в сфероиде. Таким образом, скаффолды, полученные из синтезированных полимеров, могут хорошо имитировать внеклеточный матрикс, в котором жизнеспособность и пролиферация клеток увеличивается.

Методы получения синтезированных скаффолдов, основанные на электроспиннинге, литье, 3D-печати, демонстрируют низкую воспроизводимость, поскольку матрицы производятся с некоторой степенью изменчивости от партии к партии (Mueller-Klieser, 1984). Такой недостаток приводит к получению сфероидов с невоспроизводимыми свойствами, и, таким образом, влияет на точность результатов при проведении скрининговых исследований лекарственных средств. Кроме того, некоторые терапевтические средства способны адсорбироваться на скаффолдах, что может привести к уменьшению дозы препарата и, как следствие, к ложному результату (Debnath et al., 2002).

Недостатки скаффолдных технологий также связывают с крупным размером и непрозрачностью используемых скаффолдов. Эти параметры могут затруднять визуализацию сфероидов с помощью оптических и флуоресцентных методов. Кроме того, в ряде случаев могут возникнуть трудности с извлечением сфероидов из матриц, на поверхности которых могут оставаться единичные клетки. Это может отразиться на неточности анализа трехмерных клеточных структур с помощью специальных методов, таких как проточная цитометрия или Вестерн-блот (Rimann and Graf-Hausner, 2012).

1.7. Применение трехмерных клеточных моделей для решения задач теоретической и практической медицины

В настоящее время опухолевые клеточные трехмерные модели *in vitro* начали

активно применять для прогностической оценки противоопухолевых методов лечения, таких как химиотерапия, радиотерапия, фотодинамическая терапия (ФДТ), генная терапия и иммунотерапия.

В частности, выяснилось, что мультиклеточные сфероиды представляют собой идеальную систему для исследования основных дозиметрических параметров ФДТ, таких как фотообесцвечивание фотосенсибилизатора, и, следовательно, данные, полученные на этой модели, могут быть использованы для оптимизации методов ФДТ. Эффективность ФДТ зависит от ряда параметров, таких как состояние оксигенации ткани, концентрация фотосенсибилизатора, мощность световой дозы, а также чувствительность ткани-мишени к фотодинамической терапии, которые можно оценить с помощью трехмерной клеточной модели. Также было показано, что сфероиды оказались полезны в ряде других исследований ФДТ, в том числе применения этого способа лечения в комбинированной терапии (Madsen et al., 2002).

Первые сообщения об использовании сфероидов в качестве модельной системы *in vitro* для ФДТ было сделано в 1980 гг. Т. Christensen и соавт. (Christensen et al., 1984). Ранние исследования были сосредоточены главным образом на оценке распределения гематопорфиринов (Hpd) в различных моделях сфероидов и эффектов ФДТ. С.М. West и соавт. (1989) продемонстрировали, что сфероиды карциномы толстой кишки человека более устойчивы к ФДТ с Hpd по сравнению с монослойными культурами, и чувствительность к ФДТ снижается с увеличением размера сфероида (West and Moore, 1989).

В более современных исследованиях сфероиды были использованы в качестве модели для исследования кинетики диффузии ряда фотосенсибилизаторов нового поколения. Так, В. Doix и соавт. (2018) исследовали действие фотосенсибилизатора OR141 на сфероиды, полученные из клеток меланомы мыши B16 и эпидермоидной карциномы человека A431, и определили пороговые значения диффузии OR141, которые индуцировали гибель клеток в внутренних слоях этих сфероидов (Doix et al., 2018).

S. Vogel и соавт. (2013) продемонстрировали усиленную миграцию мезенхимальных стволовых клеток (МСК) к опухолевым клеткам, предварительно подвергнутых ФДТ в сочетании с обработкой 5-аминолевулиновой кислотой (ALA/PDT) (Vogel et al., 2013). Исследование было выполнено на сфероидах, сформированных из клеточных линий глиобластомы человека U87 и U251. Авторы пришли к выводу, что данное воздействие ALA/PDT вызывает апоптоз опухолевых клеток, тем самым увеличивая высвобождение фактора роста гепатоцитов HGF, что привлекает МСК и активирует их усиленную миграцию к клеткам глиобластомы. Таким образом,

использование сфероидов показало, что такую клеточную модель можно использовать для разработки методов увеличения эффективности генной терапии, где в качестве вектора доставки используют МСК.

В области радиотерапии трехмерные опухолевые клеточные модели могут способствовать созданию системы более адекватной оценки индивидуальных реакций пациентов на лечение, что, в свою очередь, даст возможность использовать полученные данные как инструмент для разработки персонализированного подхода (Bai et al., 2015; Sachs and Clevers, 2014).

Интерес к опухолям в области радиобиологии был впервые продемонстрирован в работах R.M. Sutherland и соавт. (1970, 1971), где после облучения сфероидов, созданных из клеточной линии фибробластов легкого китайского хомячка V79, их обрабатывали трипсином, переносили в чашки Петри и строили кривые выживания в зависимости от дозы облучения. Было отмечено сходство данных по выживанию клеток опухоли пациентов и клеток сфероидов *in vitro* (Sutherland et al., 1970).

На сегодняшний день в лучевой терапии злокачественных опухолей активно разрабатываются системы целевой доставки, в том числе исследуются липосомы, нагруженные радионуклидами, способные распознавать опухолевые клетки путём взаимодействия специфических антител с рецепторами-мишенями, например, VEGF, EGFR, HER₂ и др. (Shi et al., 2015; Weng et al., 2013; Zhu et al., 2017). Подобные липосомные системы обеспечивают практически равномерный профиль поглощенной дозы в центральной области опухолевых микрометастазов за счёт повышения локальной концентрации и длительного депонирования радионуклидных веществ, таким образом, препятствуя рецидиву опухоли.

В частности, использование опухолевых сфероидов, полученных из клеточных линий рака молочной железы HER₂⁺-BT-474 и HER₂⁻-MCF₇C позволило С. Zhu и соавт. (2017) разработать способ более эффективного проникновения радионуклидных носителей в ткань опухоли (Zhu et al., 2017). Для усиления терапевтического потенциала α -частиц в лечении солидных опухолей были созданы нетаргетные нано-носители (pH-настраиваемые липосомы), которые в слабокислой опухолевой среде высвобождали формы капсулированного генератора α -частиц Actinium-225, что приводило к быстрому распределению α -частиц в модельной клеточной системе и их более глубокому проникновению внутрь, благодаря чему повышалась эффективность воздействия на опухолевые клетки. Это исследование продемонстрировало терапевтический потенциал стратегии преодоления лимитированной диффузии радионуклидных носителей в солидных опухолях, обеспечивающей высвобождение из неинтернализующих нано-

носителей молекулярных форм α -частиц.

Тумороиды являются подходящими моделями для тестирования систем доставки лекарств *in vitro*. Как известно, в реальной клинической ситуации концентрация лекарств, кислорода и питательных веществ уменьшается к центру опухоли. Эффективность лекарственного препарата *in vivo* во многом зависит от его дозы, фармакинетических свойств, молекулярной массы, заряда, растворимости в воде и липидах, диффузии, барьеров в микроокружении, связывания с мишенью, метаболизма и секвестрации. Создавая сфероиды, моделируют физиологические параметры, присутствующие в организме пациента, а именно сложную многоклеточную архитектуру, барьеры для переноса массы веществ, внутренний градиент питательных веществ, кислорода и метаболитов, что позволяет их использовать для исследований *in vitro* цитотоксичности противоопухолевых препаратов, патофизиологических градиентов и процессов их диффузии. S. L'Espérance и соавт. (2008) исследовали химиорезистентность с помощью сфероидов, полученных из шести клеточных линий рака яичника (OVCAR3, SKOV3, TOV-112, TOV-21, OV-90 и TOV-155), обработанных 10,0 мкМ цисплатина, 2,5 мкМ паклитаксела или 5,0 мкМ топотекана в течение 72 часов. Они провели профилирование экспрессии ряда генов, связанных с ростом и пролиферацией клеток, со сборкой и организацией цитоскелета, с гибелью клеток, с контролем клеточного цикла и передачей сигналов в клетках, и отметили, что опухолевые клетки в сфероидах быстро приобретают химиорезистентность к препаратам за счёт гиперэкспрессии генов, ответственных за остановку клеточного цикла, а также за репарацию и репликацию ДНК (*BRCA1*, *BRCA2*, *DDB2*, *FANCA*) (L'Espérance et al., 2008). При этом подобную гиперэкспрессию генов не наблюдали в монослойных культурах. Согласно мнению многих исследователей сфероиды оказались особенно ценной моделью в исследовании ответа опухолевых клеток на химиотерапию и радиотерапию (Hirschhaeuser et al., 2010).

В ряде работ было показано, что, несмотря на длительное по времени воздействие, некоторые лекарственные препараты могут проникать лишь в незначительном количестве на глубину, равной размеру нескольких клеток (Bruce et al., 2009; Kostarellos et al., 2005; Ying et al., 2010). В частности, A.I. Minchinton (2006) в работе, посвященной анализу имеющихся данных о распространении химиопрепаратов в тканях солидных опухолей, описывает стратегии улучшения распределения препаратов в опухолевых тканях, апробированные на моделях сфероидов (Minchinton and Tannock, 2006). Известно, что внеклеточный матрикс влияет на распределение препаратов внутри опухоли. Обработка сфероидов солидных опухолей гиалуронидазой (фермент из группы энзимов, расщепляющих кислые мукополисахариды, в том числе гиалуроновую кислоту) повышает

чувствительность к химиопрепаратам (St. Croix et al., 1998). Ещё одна стратегия связана с плотностью «упаковки» сфероидов: сфероиды, полученные из клеточной сублинии рака толстой кишки человека НСТ-8, не экспрессировали молекулы адгезии α -E катенин по сравнению с родительскими клетками, что приводило к пониженной плотности клеток. Поэтому предварительная обработка таких сфероидов низкими дозами препарата с предварительным введением антиадгезивных агентов в среду способствовала лучшему проникновению внутрь противоопухолевых химиотерапевтических агентов (Jang et al., 2001).

Было также обнаружено, что из-за рН-градиентов, существующих внутри сфероидов, клетки некротической зоны могут быть защищены от цитотоксического действия слабокислых препаратов, таких как митоксантроны и антрациклины, когда как действие слабощелочных препаратов, таких как хлорамбуцил и митомицин С, усиливается (Knuchel et al., 1989; Kozin and Gerweck, 1998; Tannock and Rotin, 1989).

За последние десятилетия одним из подходов улучшения эффективности химиотерапевтических агентов являлась разработка нанотехнологий в сфере доставки лекарственных препаратов, где разнообразные наночастицы выступают в роли их носителей за счет инкапсуляции гидрофобных химиопрепаратов и эффективнее проникают и накапливаются в ткани опухоли за счёт связи со специфическими молекулами-мишенями (Yokoi et al., 2014). Существенным барьером для накопления наночастиц в опухолях является высокое внутриопухолевое давление, формирующееся в результате особенностей сосудистой сети, нарушений функций лимфатической системы, а также затрудненной диффузии, вызванной агрессивным характером роста клеток, наличием фиброза и уплотнением внеклеточного матрикса (Blanco et al., 2015). S. Lu и соавт. (2018) использовали сфероиды, полученные из линии карциномы легкого человека A549, для оценки проникновения в опухоль наноконъюгата доксорубицина (Dox), интеркалируемого в каркас ДНК, включающий АТФ-связывающий аптамер, с катионным пептидным амфифилом РАН6 (Lu et al., 2018). При попадании в опухоль доксорубицин высвобождался из наноконъюгата в среде, обогащенной АТФ. Было обнаружено, что конъюгат Dox-ДНК/РАН6 приводит к дезинтеграции опухолевых сфероидов, в то время как обработанные чистым Dox сфероиды сохраняют свою форму. Таким образом, эта работа продемонстрировала эффективность трехмерного клеточного моделирования для разработки новых наностратегий противоопухолевого лечения.

В настоящее время трехмерное клеточное моделирование все чаще рассматривают как важный этап в разработке противоопухолевых препаратов, направленных на ингибирование процессов инвазии и метастазирования (Friedrich et al., 2009; Lin and

Chang, 2008). Так, S. Gunther и соавт. (2007) исследовали действие полифенолов на опухолевые сфероиды, полученные из линии рака молочной железы мыши 4T1. Они инкубировали сфероиды с полифенолами и отметили торможение роста и метастазирования. Обработка полифенолами снижала выработку активных форм кислорода и экспрессию металлопротеиназы MMP-9, участвующей в ремоделировании внеклеточного матрикса (Günther et al., 2007).

Сфероиды также широко используются в базовых исследованиях взаимодействия опухолевых клеток с микросредой, регулирования пролиферации, жизнеспособности, метаболизма питательных веществ, инвазии, взаимодействия клеток между собой и с внеклеточным матриксом. Известно, что микроокружение опухоли представляет собой сложную и высокодинамичную среду, которая играет важную роль в механизмах развития опухоли. При исследовании химиорезистентности гетеросфероидов M. Majety и соавт. (2015) удалось продемонстрировать, что при трехмерном кокультивировании злокачественных клеток и клеток стромы опухоли в ряде случаев происходит усиление пролиферации опухолевых клеток, в частности, это было показано для культуры клеток рака поджелудочной железы (Majety et al., 2015). Кроме того, было обнаружено, что совместное культивирование с фибробластами легкого эмбриона человека MRC-5 или фибробластами, ассоциированными с опухолью, индуцирует дифференциальную продукцию растворимых факторов, таких как эпидермальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, интерлейкин-6. Обработка блокирующими антителами против выбранных факторов или их рецепторов приводило к ингибированию пролиферации опухолевых клеток. Использование подобной модели кокультивирования позволило установить, что опухолеассоциированные фибробласты могут влиять на эффективность терапевтических агентов *in vitro*, в частности, было показано усиление резистентности к ингибиторам эпидермального фактора роста для культур рака легкого. Полученные результаты позволили авторам сделать вывод о пригодности трехмерной клеточной модели как инструмента для изучения взаимодействия опухолевых клеток и их микроокружения.

Есть данные о том, что кокультивирование клеточной линии немелкоклеточного рака легкого H358 с фибробластами легкого эмбриона человека WI-38 в сфероидах способствовало росту последних и предотвращало гибель малигнизированных клеток под воздействием паклитаксела через паракринную передачу сигналов (Bartling et al., 2008). N. Baek и соавт. (2016) использовали 3D-систему культивирования клеточной линии остеосаркомы U-2OS для мониторинга воздействия доксорубина (Baek et al., 2016b) и цисплатина (Baek et al., 2016a). Анализируя морфологические (рост и форма) и энергетические (АТФ) параметры изменения сфероидов в режиме реального времени,

авторы пришли к выводу, что барьером для проникновения цитотоксических агентов является внеклеточный матрикс.

Тумороиды используют для изучения взаимодействия опухолевых клеток и клеток иммунной системы. Например, был произведен анализ дифференцировки макрофагов и их активации на модели совместного культивирования опухолевых сфероидов и суспензии моноцитов (Konig et al., 1996). Сфероиды, полученные из клеточной линии рака толстой кишки HT-29, моноцитов и фибробластов, демонстрировали более высокую экспрессию протеолитического фермента катепсина В, что коррелировало с пятикратным увеличением инвазивного потенциала малигнизированных клеток по сравнению с культурой моносфероидов HT-29. Эти результаты показывают, что подобные сложные системы, состоящие из нескольких компонентов, позволяют проследить коэволюцию опухолевых и нормальных клеток за счёт реципрокных связей между ними и воспроизводить физиологические и биологические особенности злокачественного новообразования (Quail and Joyce, 2013).

Т. Courau и соавт. (2019) проанализировали гетеротипические сфероиды, полученные из клеточных линий колоректального рака человека HT-29 и DLD-1, после кокультивирования с мононуклеарными клетками, выделенными из периферической крови, для оценки инфильтрации, активации и функций Т-лимфоцитов и НК-клеток в модельной системе *in vitro* (Courau et al., 2019). В этом исследовании удалось показать, что аллогенные Т- и НК-клетки быстро инфильтрируют сфероиды, вызывая иммуноопосредованный апоптоз опухолевых клеток и разрушение сфероидов. Данная система позволила оценить терапевтический потенциал антитела, нацеленного на специфические лиганды NKG2D: MICA и MICB. Эти наблюдения были подтверждены уже в клинически значимой модели кокультуры сфероидов, полученных из клеток колоректального рака, выделенных из опухолей пациентов, и аутологичных опухолинфильтрирующих лимфоцитов. Таким образом, трехмерные клеточные модели для всех типов опухолей человека позволяют динамически изучать противоопухолевый иммунный ответ, возникающий у пациентов, и в конечном итоге, обладают предикторными возможностями в отношении определения эффективности противоопухолевой иммунотерапии.

1.8. Заключение

Таким образом, можно считать, что опухолевые 3D-системы по сравнению с остальными модельными системами могут более точно имитировать биологические особенности опухолей, тем самым представляя собой надежную модель для

высокопроизводительного скрининга лекарств и доклинической апробации других видов противоопухолевой терапии.

Изучение с помощью тумороидов структурных характеристик злокачественного новообразования, экспрессии им ряда факторов и молекул, инвазивных особенностей и механизмов формирования лекарственной устойчивости может играть критическую роль в индивидуализации противоопухолевой терапии и иметь прогностическое значение в оценке развития злокачественных новообразований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2018 по 2020 гг. интраоперационно были получены образцы опухолей 6 пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова с подтвержденным биопсией диагнозом, послужившие материалом для приготовления опухолевых клеточных культур. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом НМИЦ, от всех пациентов было получено информированное согласие, а образцы тканей хранили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и использовали в соответствии с Законом о тканях человека от 2004 года. Было выделено 6 клеточных культур: плеоморфной липосаркомы (1), миксофибросаркомы (2), эмбриональной рабдомиосаркомы (1), веретенклеточной беспигментной меланомы (1), рака молочной железы (1).

Дополнительно в исследовании были использованы опухолевые клеточные линии, хранящиеся в коллекции биобанка ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России : леймиосаркома (№ 699), остеогенная саркома (№ 793), меланома кожи (№ 912), меланома кожи (№ 916).

Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1 и табл 2.

Таблица 1. Гистотипическая принадлежность полученных культур, распределение по локализации опухоли и продолжительность культивирования

№ клеточной культуры	Пациент, возраст	Пол	Стадия опухолевого процесса	Гистологический тип	Гистологический подтип	Пассаж	Предшествующее лечение	Тестирование препаратов на 2D- и 3D-системы
702	Д., 48	Ж	Первичная	Опухоли из жировой ткани	Плеоморфная липосаркома	>50	Химиотерапию не получала	Доксорубицин+ Ифосфамид
728	П., 66	М	Метастаз	Фибробластические/ Миобластические опухоли	Миксофибросаркома	>50	ADIC (доксорубицин+ дакарбазин) - стабилизация , СМ (циклофосфан+метотрексат)- прогрессирование	Доксорубицин+ Ифосфамид; Паклитаксел
862	К., 13	М	Метастаз	Опухоли скелетных мышц	Эмбриональная рабдомиосаркома	>50	винкристин+ифосфамид+этопозид; винкристин+карбоплатин+эпирубицин; винкристин+ топотекан +циклофосфамид - частичный регресс ; ICE (ифосфамид+карбоплатин+этопозид) - прогрессирование	Доксорубицин+ Ифосфамид; Паклитаксел
982	А., 66	Ж	Метастаз	Фибробластические/ Миобластические опухоли	Миксофибросаркома	>50	Прогрессирование во время терапии (AI,GemTax)	Доксорубицин+ Ифосфамид; Паклитаксел
929	С., 41	Ж	Метастаз	Опухоли нейроэктодермального происхождения	Веретеночклеточная беспигментная меланома	>50	BRAF- и MEK- ингибиторы, ниволумаб; паклитаксел+ карбоплатин - прогрессирование Вемурафениб +ипилиimumаб прогрессирование.	Доксорубицин+ Ифосфамид; Цисплатин
973	К., 40	Ж	Первичная	Аденокарцинома	Рак молочной железы	>50	АС (доксорубицин+циклофосфамид); ТР (доцетаксел карбоплатин);эрибулин капецитабин Прогрессирование во время терапии	Доксорубицин+ Ифосфамид; Паклитаксел

Таблица 2. Характеристика пациентов, из биоматериала которых были выделены опухолевые культуры, хранящиеся в биобанке «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова».

№ клеточной культуры	Пациент, возраст	Пол	Стадия опухолевого процесса	Гистологический тип	Гистологический подтип	пассаж	Предшествующее лечение	Тестирование препаратов на 2D- и 3D-системы
699	С., 28	Ж	Метастаз	Миобластические опухоли	Лейомиосаркома	>50	прогрессирование во время терапии GemTax, Трабектидин, частичный регресс , разнонаправленная динамика AI, I	–
793	К., 40	Ж	Первичная	Саркомы костей	Остеогенная саркома	>50	дакарбазин+доксрубицин+циклофосфамид; цисплатин+ циклофосфамид+ винкрестин; синдаксел+ карбоплатин; IE. GemTax - прогрессирование	–
912	Ш., 30	Ж	Метастаз	Опухоли нейроэктодермального происхождения	Веретеночлечная беспигментная меланома	>50	ниволумаб - прогрессирование . Ипилимумаб - регресс . BRAF и MEK ингибиторы - прогрессирование, частичный регресс на фоне терапии ниволумабом и ипилимумабом.	–
916	С., 36	Ж	Метастаз	Опухоли нейроэктодермального происхождения	Эпителиоидно-клеточная меланома	>50	темозодамид; дабрафениб + траметиниб; ипилимумаб; пембролизумаб - прогрессирование на фоне лечения.	–

2.1. Культивирование опухолевых клеток в монослое

В течение 30 мин после резекции опухоли фрагменты размером не менее 1 см³ отбирали в пробирки со стерильной питательной средой DMEM/F12 (Биолот, Россия). Опухолевый материал помещали в стерильную чашку Петри с 5 мл предварительно нагретой до 37°C питательной среды и осуществляли рассечение и тщательное измельчение стерильными скальпелями до фрагментов размером не более 3 мм.

Последующее механическое измельчение фрагментов продолжали с использованием медиконов, помещенных в медимашину (Agilent Technologies, США). Фильтрацию полученной клеточной суспензии осуществляли через нейлоновые фильтры 100 мкм (BD Falcon, США). Затем подвергали центрифугированию (10 минут, 1600 об/мин), сливали супернатант, а осадок ресуспендировали в полной питательной среде (ППС), состоящей из:

- DMEM/F12 (Биолот, Россия);
- 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота – FCS (Биолот, Россия);
- L-глутамин – 266,7 мкг/мл. (Биолот, Россия);
- Трансферрин-инсулин-селен (ITS) – 10 мкг/мл, 5,5 мкг/мл, 6,7 нг/мл, соответственно. (Gibco, США);
- Пенициллин/Стрептомицин – 100 ед/мл и 100 мкг/мл, соответственно. (Биолот, Россия).

Для определения жизнеспособности клеток использовали окрашивание трипановым синим на предметном стекле. Затем подсчёт жизнеспособных опухолевых клеток производили в автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, USA).

Культивирование опухолевых клеток осуществляли по протоколу, основанному на методе Freshney с собственными модификациями (Freshney R.I., 2010; Danilov A.O et al., 2004)

Выделенные опухолевые клетки культивировали в пластиковых флаконах (Sarstedt, Германия) в условиях CO₂-инкубатора «Heracel» (Thermo Electron LTD GmbH, Германия) при 37 °C, во влажной атмосфере с 5% уровнем CO₂.

В случае успешного получения первичной культуры осуществляли смену среды не реже чем раз в неделю до достижения клетками монослоя, после чего пересеивали с применением смеси 0,25% раствора трипсина (Биолот, Россия) и 0,02% версена (Биолот, Россия) в равных пропорциях с последующим центрифугированием и подсчётом жизнеспособных клеток.

2.1.1. Криоконсервация опухолевых клеток

Криоконсервацию опухолевых клеток осуществляли с помощью криосреды, содержащей 90% FCS (Биолот, Россия) и 10% DMSO (Биолот, Россия) с предварительным подсчетом в концентрации не менее 2 млн клеток и с жизнеспособностью не ниже 90%. Пробирки с клетками сначала помещали в штатив для хранения криопробирок, содержащий изопропиловый спирт, а затем в холодильник при температуре -80 °С. Скорость замораживания составляла 1°С/мин, что позволяло избежать резкого снижения температуры, медленно и равномерно замораживания клетки в криопробирках.

Затем охлажденные до -80°С образцы помещали в биобанк при -160°С, где хранили до последующего использования.

2.1.2. Разморозка опухолевых клеток

Криопробирку с опухолевыми клетками после извлечения из биобанка помещали на 3 минуты в водяную баню при температуре +42 °С. Оттаившие клетки с криосредой переносили в стерильную пробирку объемом 15 мл, разбавляли десятикратным объемом DMEM/F12, центрифугировали (10 мин, 1600 об/мин) и производили подсчет жизнеспособных клеток, окрашенных трипановым синим в автоматическом счетчике Countess (Invitrogen, USA).

2.2. Культивирование опухолевых клеток в тумороидах

2.2.1. Метод висячей капли – Hanging drop method

Клетки в различных посевных концентрациях были помещены в 25 мкл капли полной питательной среды (DMEM, 10% FBS, Glu). В нижнюю часть чашки был залит 0,9 % раствор NaCl. После чашки Петри были помещены в CO₂-инкубатор «Heracel» (Thermo Electron LTD GmbH, Германия) при 37 °С, во влажной атмосфере с 5% уровнем CO₂ от 3–8 суток в зависимости от клеточной линии.

В процессе культивирования на 3-е сутки проводилась смена среды в каплях. По окончании культивирования изъятые из капель сфероиды отмывали в 1-кратном растворе PBS (pH 7.4) для последующих манипуляций.

2.2.2. Технология получения сфероидов на низкоадгезивных поверхностях – Liquid overlay technique

Для получения тумороидов с помощью технологии Liquid overlay technique на

низкоадгезивных поверхностях использовали планшеты 96-well black plate with glass bottom Ultra-Low Attachment Surface (Corning, USA). Клетки в различных посевных концентрациях помещали в лунки планшета и доводили содержимое питательной средой DMEM/F12 до 200 мкл. Тумороиды культивировали от 3 до 8 суток в зависимости от клеточной линии в CO₂-инкубаторе «Heracel» (Thermo Electron LTD GmbH, Германия) при 37 °C, во влажной атмосфере с 5% уровнем CO₂. По окончании культивирования изъятые из капель сфероиды отмывали в 1-кратном растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) (pH 7.4) для последующих исследований.

2.3. Конфокальная микроскопия

Для микроскопирования отмытые от среды тумороиды фиксировали с помощью 10% водного раствора формальдегида и оставляли в холодильнике при температуре -5°C на 24 часа. Затем тумороиды отмывали в 1-кратном растворе PBS (pH 7.4), окрашивали Phalloidin–Alexa488 + PI в концентрации 2 мкМ и 4 мкМ, соответственно, в 100 мкл PBS pH 7.4. Инкубировали в темноте в течение 1 часа. После инкубации тумороиды отмывали снова PBS (pH 7.4) и получали изображения с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 710, при этом осуществляли просмотр по двум каналам + Z-stack (Zeiss, Германия) на объективе 40x oil immersion (Plan-Apochromat 40x/1.4). Время экспозиции составляло 100-200 мсек, используемые фильтры Phalloidin-alexa 488 – 488 нм, для PI – 546 нм. Полученные изображения анализировали с помощью ZEN Microscope Software 2.1 на Windows7-64-bit (Zeiss, Германия) (Geraldo et al., 2013).

2.4. Иммуногисто-/цитохимический анализ

2.4.1. Подготовка образцов

1. Клетки культивировали в виде тумороидов, полученных методом «Liquid overlay technique» в стандартных условиях при 37°C, 5% CO₂, 100% влажности с использованием среды DMEM/F-12, содержащей 20% FCS и глутамин. Отмытые от среды тумороиды фиксировали с помощью 10% водного раствора формальдегида и оставляли в холодильнике при температуре -5°C на 2 часа. Далее отмывали в растворе PBS (pH 7.4) и фиксировали в агар-агаре. Обезвоживание материала производили абсолютным изопропиловым спиртом. Для гистологической заливки тканей использовали парафин (Гистомикс, Биовитрум, Россия).

Парафиновые блоки помещали в микротом SM2000R (Leica, Germany), который использовали для получения серийных срезов толщиной не более 4 мм. Срезы аккуратно переносили на смоченное дистиллированной водой стекло SuperFrost Plus (Braunschweig,

Germany), затем в водяную баню для расплавления 10-15 сек. Предметное стекло с парафиновым срезом сушили в термостате при температуре 37-42 °С в течение 1 часа для более прочного соединения среза со стеклом. Для детекции объектов каждый десятый срез был окрашен гематоксилином Майера и эозином.

2. Опухолевые клетки, выращенные в монослое на культуральных стёклах в стандартных условиях, отмывали раствором PBS (pH 7.4), фиксировали в абсолютном ацетоне 2-3 минуты, высушивали на воздухе, помещали в герметичные контейнеры и хранили при температуре -20°C до использования.

3. Образцы опухолевой ткани после вырезки фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 6-24 часов. Не менее чем через 24 часа материал промывали проточной водой 5-10 минут, помещали в кассеты, затем в процессор Leica TP1020 карусельного типа (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Германия). Обезвоживание материала производили абсолютным изопропиловым спиртом. Для гистологической заливки тканей использовали парафин (Биовитрум, Россия). Парафиновые блоки опухолевой ткани обрабатывали как описано выше.

2.4.2. Иммуногисто-/цитохимический метод выявления антигенов

Детекция антигенов GLUT-1 и E-cadherin была проведена на парафиновых срезах опухолевой ткани, полученной интраоперационно, и тумороидов после депарафинизации и ингибирования эндогенной пероксидазы. Также детекция данных антигенов была проведена на препаратах монослойных опухолевых культур после фиксации в абсолютном ацетоне и ингибирования эндогенной пероксидазы. Антигенные детерминанты восстанавливали с помощью TRIS-EDTA Retrieval Buffer (pH 9, x10) при 96-97°C. Затем наносили 100-300 мкл раствора антител с соответствующим титром согласно инструкции производителей и инкубировали в течение 30 минут:

- Кроличьи поликлональные антитела к GLUT1 – GLUT1 Rabbit Polyclonal Antibody (Abcam, США)
- Антитела мышинные моноклональные к панкадгерину – Mouse anti Cadherin (Diagnostic BioSystems, США).

После инкубации производили отмывку TBS-буфером и наносили вторичные антитела, связанные с активационным реагентом – EnVision FLEX HRP (Dako, Denmark), инкубировали при комнатной температуре 30 мин. После инкубации промывали TBS-буфером и производили визуализацию диаминобензидином (DAB) при комнатной температуре 10 мин. Промывали TBS-буфером и осуществляли докраску ядер клеток гематоксилином Майера. Образцы обезвоживали серией погружений в изопропиловый

спирт, ксилол и заключали в бальзам.

Иммуногисто-/цитохимию (ИГХ/ИЦХ) для выявления антигена Ki-67 осуществляли на автоматизированном приборе – иммуногистостейнере, BenchMark ULTRA Ventana (Ventana Medical Systems, Inc., Germany), с использованием коммерческих реактивов и стандартных протоколов производителя. Использовали кроличьи моноклональные антитела к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 – anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Diagnostic BioSystems, США). Визуализацию осуществляли с помощью комплекта DAB-MAP Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., Germany). Докрашивали препараты гематоксилином (Ventana Medical Systems, Inc., Germany) в течение 4 минут. Далее препараты обрабатывали как описано выше.

Цифровые изображения препаратов были получены с помощью микроскопа Digital scanning microscope Panoramic 1000 (3DHISTECH Ltd., Hungary). Объектив: Carl-Zeiss Plan-Apochromat 40×Corr / NA 0.95. Камера: Adimec QUARTZ Q-12A180 providing resolution 69 Мр/мм². Сканы цифровых изображений были получены с помощью программного обеспечения CaseViewer 2.2.1 (3DHISTECH Ltd., Hungary).

2.5. Анализ продукции альдегиддегидрогеназы (ALDH) с помощью проточной цитофлуориметрии

Опухолевые клетки, выращенные в 2D и 3D формате, подвергали диссоциации с помощью равновесного раствора трипсина-версена (0,25% и 0,02%, соответственно) (Биолот, Россия) и использовали для анализа.

Активность ALDH определяли методом проточной цитометрии с использованием набора ALDEFLUOR™ Kit (STEMCELL Technologies Inc., Канада). Принцип метода основан на использовании BODIPY-аминоацетальдегида – незаряженного субстрата ALDH, проникающего в клетку путем пассивной диффузии. Под воздействием исследуемого фермента он превращается в заряженный BODIPY-аминоацетат, флюоресценция которого детектируется проточным цитометром на длине волны 520-540 нм. Клетки в количестве 10⁵-10⁶ ресуспендировали в 1 мл буфера для исследования, данную пробирку обозначали как тестовую. В пустую контрольную пробирку вносили 5 мкл специфического ингибитора ALDH диэтиламинобензальдегида (DEAB). В тестовую пробирку добавляли 5 мкл BODIPY-аминоацетальдегида, перемешивали и быстро переносили 500 мкл клеточной суспензии в контрольную пробирку. Клетки инкубировали в течение 30 минут при 37°C, затем осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1500 об/мин. После удаления супернатантов клетки ресуспендировали в 500 мкл буфера

для исследования и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACS Canto™ II (BD Bioscience, США). Гейтирование осуществляли по негативной популяции в контрольной пробирке.

2.6. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Исследовали методом ИФА супернатанты клеточных культур, выращиваемых в монослое (2D-формат) и в виде сфероидов (3D-формат). Забор кондиционированной среды осуществлялся через 7 дней от начала культивирования (пассажа). Супернатанты культур опухолевых клеток хранили при -20°C и размораживали на льду непосредственно перед определением концентрации исследуемых веществ. Выявляли лиганд рецептора NKG2D цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров MICA методом ИФА в «сэндвич»-варианте с использованием набора DuoSet ELISA Kit (R&D Systems, США).

Все этапы процедуры проводили при комнатной температуре. В 96-луночную планшету для ИФА вносили «захватывающие» антитела (моноклональные мышинные антитела против MICA человека) в конечной концентрации 2,0 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS) в количестве 100 мкл на лунку. Инкубировали 12 ч, затем удаляли раствор из лунок и промывали трижды PBS, содержащим 0,05% Tween-20, pH 7,2 – 7,4. Процедуру промывки повторяли после каждого этапа взаимодействия реагентов.

Для блокады неспецифического связывания инкубировали планшету в течение 1 ч с PBS, содержащим 1% BSA, pH 7,2 – 7,4, предварительно пропущенным через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Затем вносили по 100 мкл на лунку стандарты и образцы на 2 ч. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали рекомбинантный MICA человека в серии концентраций (начальная концентрация - 4000 пг/мл, конечная – 15,125 пг/мл). Каждый образец вносили в двух повторах.

Далее следовал этап внесения «детектирующих» антител (биотинилированные козы антитела против MICA человека), которые добавляли по 100 мкл на лунку в конечной концентрации 400 нг/мл в PBS, содержащем 1% BSA и 2% инактивированной козьей сыворотки крови. Инкубацию проводили в течение 2 ч. Затем вносили по 100 мкл на лунку Streptavidin-HRP-комплекс, представляющий собой полимерный конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена, в разведении 1:200, инкубировали 20 мин. в темноте.

Далее добавляли по 100 мкл субстратного раствора, состоящего из равновесной смеси водного раствора H_2O_2 и тетраметилбензидина, и инкубировали также 20 мин. в темноте, после чего вносили по 50 мкл 2N раствора серной кислоты (стоп-раствор) для остановки реакции и немедленно измеряли оптическую плотность в каждой лунке планшеты с помощью микропланшетного ридера Thermo Scientific Multiscan EX (Thermo

LabSystems Inc., США) с блоком считывания и обработки информации при длине волны 450 нм.

2.7. Мультиплексный анализ

Уровень цитокинов (противовоспалительного цитокина IL-10, фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, MIF) и хемокинов (фактора хемотаксиса моноцитов MCP-1/CCL2 и макрофагального воспалительного белка MIP-1a/CCL3, хемокиновый лиганд SCYB16/CXCL16, хемоаттрактант SDF-1/CXCL12), продуцируемых монослойными культурами и опухолевыми сфероидными, определяли в супернатантах с помощью мультиплексного анализатора Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, США).

Магнитные частицы, детектирующие антитела и SA-PE (стрептовидин, конъюгированный с фикоэритрином) разводили согласно инструкции производителя соответствующими дилуентами. Магнитные частицы переносили в 96-луночный планшет с помощью многоканального дозатора по 50 мкл в лунку. Планшет дважды отмывали с помощью промывающего устройства Bio-Plex Pro™ II Wash Station (Bio-Rad, США), программа MAGx2.

В планшет переносили стандартные образцы, отрицательный контроль - полную питательную среду и образцы супернатантов по 50 мкл в лунку в дублях, инкубировали 30 минут на шейкере при 850 rpm при комнатной температуре в темноте, трижды отмывали с помощью промывающего устройства (программа MAGx3).

С помощью многоканального дозатора в планшет переносили детектирующие антитела по 25 мкл в лунку, инкубировали 30 минут на шейкере (850 rpm) при комнатной температуре в темноте, трижды отмывали с помощью промывающего устройства (программа MAGx3).

Затем в планшет переносили SA-PE (x1) по 50 мкл в лунку, инкубировали 10 минут на шейкере (850 rpm) при комнатной температуре в темноте, трижды отмывали с помощью промывающего устройства (программа MAGx3).

Далее в планшет переносили буфер для исследования по 125 мкл в лунку, инкубировали 30 секунд на шейкере (850 rpm) при комнатной температуре в темноте.

Планшет анализировали с помощью системы мультиплексного анализа Bio-Plex® 200, Bio-Rad, США с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager™, Bio-Rad, США.

На основе 8 разведений стандарта с помощью программного обеспечения строили калибровочные кривые для каждого аналита. Полученные в ходе анализа значения интенсивности флюоресценции автоматически экстраполировались на стандартную кривую для расчета концентрации. Значения, экстраполированные ниже определяемого

диапазона, принимали за «0».

Результат представляет собой среднюю концентрацию аналита в пг/мл, рассчитанную на основе двух полученных значений для каждого образца.

2.8. Исследование цитотоксического действия химиопрепаратов на монослойные культуры и сфероиды

Для оценки химиочувствительности и инвазивных свойств опухолевых клеток, культивируемых в 2D- и 3D-системах, использовали различные химиотерапевтические агенты и их комбинации, применяемые в клинике.

Было изучено воздействие:

- Доксорубицин (Лэнс-фарм, Россия) + Ифосфамид (Холоксан, Бакстер онкология гмбх, Германия);
- Цисплатин (Цисплатин-Тева, Израиль);
- Паклитаксел (Новалек Фармасьютикалс, Индия).

Для расчета действующей концентрации препарата использовали информацию о его пиковой концентрации в плазме крови согласно рекомендациям Salmon S.E. (Salmon S.E. et al. 1980). В приведенном руководстве рекомендовано принимать в качестве эквивалента терапевтической дозе, концентрацию, равную 10% от расчетной пиковой концентрации препарата в плазме крови.

Для оценки химиорезистентности опухолевых клеток был использован МТТ-тест. Для постановки МТТ-теста были применены 2 концентрации химиопрепаратов: терапевтическая (соответствующая 10% от пиковой концентрации в плазме) и десятикратно превышающая терапевтическую (соответствующая пику концентрации в плазме). Время инкубации в условиях CO₂-инкубатора (+37°C, 5-6.5 % CO₂) с химиопрепаратом соответствовало времени полувыведения химиопрепарата из организма человека (Табл. 3).

Таблица 3. Фармакинетические характеристики исследуемых химиопрепаратов.

Название препарата	Пик концентрации препарата в плазме крови, мкг/мл	10% от пиковой концентрации препарата в плазме крови, мкг/мл	Период полувыведения из организма, ч
Доксорубицин	0,5	0,05	20
Ифосфамид	222	22,2	15

Паклитаксел	2,17	0,217	13
Цисплатин	2,5	0,25	2

2.8.1. МТТ-тест

МТТ-тест обнаруживает NAD(P)H-зависимую клеточную оксидоредуктазную активность, которая, согласно общепринятому мнению, отражает жизнеспособность клеток. Этот фермент восстанавливает тетразолиевый краситель МТТ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид до нерастворимого формазана.

Клеточные линии были высажены плоскодонные 96-луночные планшеты и помещены в CO₂-инкубатор (+37 °С, 5-6.5% CO₂) на 3 суток. Весь планшет был поделен на следующие группы:

- контрольная группа – 4 лунки;
- экспериментальная группа: Добавление исследуемого химиопрепарата (пик концентрации в плазме крови) – 4 лунки;
- экспериментальная группа: Добавление исследуемого химиопрепарата (10 % от пика концентрации в плазме крови) – 4 лунки.

Опухолевые сфероиды получали с помощью 96-well black plate with glass bottom Ultra-Low Attachment Surface (Corning, USA) в течение 6 суток в условиях CO₂-инкубатора (+37 °С, 5-6.5 % CO₂). Весь планшет был поделен на следующие группы:

- контрольная группа – 2 сфероиды;
- экспериментальная группа: Добавление исследуемого химиопрепарата (пик концентрации в плазме крови) – 2 сфероиды;
- экспериментальная группа: Добавление исследуемого химиопрепарата (10 % от пика концентрации в плазме крови) – 2 сфероиды.

Через 3 суток в среду добавляли химиопрепараты к монослойным культурам и через 6 суток к опухолевым сфероидам. Время инкубации в условиях CO₂-инкубатора (+37°С, 5-6.5 % CO₂) с химиопрепаратами соответствовало времени полувыведения химиопрепарата из организма (Табл. 2). По окончании культивирования с химиопрепаратом получали изображения монослойных культур с помощью микроскопа ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad Laboratories, США) и изображения опухолевых сфероидов с помощью фазового контрастного микроскопа Zeiss Primo Vert (4x 0,10) (Zeiss, Germany).

Затем в лунки, где культивировались монослойные клеточные линии и опухолевые сфероиды, вносили по 10 µl МТТ (Roche, Basel, Switzerland) в конечной концентрации 0.5

mg/ml и инкубировали в течении 4 часов (для монослойных культур) и в течении 24 часов (для опухолевых сфероидов) в условиях CO₂-инкубатора (+37 °C, 5-6.5 % CO₂).

Через 4 часа у монослойных культур удаляли супернатант и добавляли 100 µl DMSO на 1 ч. У опухолевых сфероидов через 24 часа содержимое лунок переносили в эппендорфы, центрифугировали, удаляли супернатанты и добавляли 100 µl DMSO на 1 ч. Затем раствор переносили в плоскодонный нестерильный 96-луночный планшет.

Оптическую плотность (ОП) полученных растворов измеряли на фотометре для микропланшетов iMark (Bio-Rad Laboratories, США) на длине волны 595 nm. Для перевода единиц оптической плотности в проценты жизнеспособности использовали формулу: (ОП исследуемого образца - ОП контрольной группы)*100%.

2.9. Исследование инвазивных свойств опухолюидов в матригеле с помощью автоматической аналитической системы Cell-IQ

Опухолевые сфероиды, полученные, как описано выше, с помощью 96-well black plate with glass bottom Ultra-Low Attachment Surface (Corning, USA), были исследованы в режиме реального времени для изучения инвазивных свойств опухолевых клеток под влиянием цитостатиков в трехмерном пространстве. В качестве трехмерной матрицы был использован Матригель (Corning® Matrigel® Matrix, NY, США). Весь планшет был поделен на следующие группы:

- контрольная группа – 2 сфероида;
- экспериментальная группа: Добавление исследуемого химиопрепарата (пик концентрации в плазме крови) – 2 сфероида;
- экспериментальная группа: Добавление исследуемого химиопрепарата (10 % от пика концентрации в плазме крови) – 2 сфероида.

Раствор матригеля готовили на холоду в соотношении 1:4 к полной питательной среде (DMEM/F-12, 10% FBS, Glu). Готовый раствор матригеля в объеме 50 µl с помощью дозатора с предварительно охлажденными типсами переносили в лунки предварительно охлажденного 48-луночного планшета и равномерно распределяли его по дну. После помещали планшет в CO₂-инкубатор (+37 °C, 5-6.5% CO₂) на 30 минут для полимеризации матригеля.

Опухолевые сфероиды отмывали однократным раствором PBS, после чего высаживали в ячейки 48-луночного планшета, предварительно покрытого полимеризованным матригелем, с добавлением 700 µl полной питательной среды

(DMEM/F-12, 10% FBS, Glu) полной питательной среды (DMEM/F-12, 10% FBS, Glu) + химиопрепарат.

Планшет помещали в автоматизированную аналитическую систему Cell-IQ® (automated cell culture and analysis system, CM Technologies Oy, Finland) на 96 часов и с помощью программного обеспечения Cell-IQ® Imagen™ (CM Technologies Oy, Finland) осуществляли контроль за распространением опухолевого узла в матриксе.

Анализ изменения занимаемой опухолевым узлом площади (Area size) и диаметра (Diameter) осуществляли с помощью программного обеспечения Cell-IQ® Analyser™ (CM Technologies Oy, Finland), которое автоматизирует процесс количественного измерения нескольких параметров клеток на основе фазового контраста.

2.10. Статистическая обработка данных

Для анализа использовали W-критерий Уилкоксона для связанных выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Хранение, обработку, статистический анализ данных и визуализацию результатов осуществляли с использованием Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, США). Систематизацию, статистический анализ и визуализацию данных проводили с помощью R v. 4.0.1. (Everitt B.S. et al., 2004).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Морфологические характеристики опухолевых культур

Удалось получить 6 стабильно пролиферирующих культур из операционного материала 6 пациентов и криоконсервировать их в биобанке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Предоперационный диагноз пациентов был подтвержден гистологической и иммуногистохимической оценкой резецированных опухолей, которые были классифицированы в соответствии с диагностическими категориями ВОЗ (ссылка) (Табл. 1).

Клетки миксофибросарком (728, 982) характеризовались морфологической гетерогенностью: в культурах этих опухолей были веретеновидная, фибробластоподобная, округлая, полигональная форма клеток. При этом преобладали клетки округлой формы (Рис. 3В, Д). Клетки эмбриональной рабдомиосаркомы (862) имели веретеновидную форму. В процессе роста в монослое клетки имели тенденцию к образованию спиралевидных скоплений (Рис. 3Е). В культуре клеток липосаркомы (702) наблюдали округлые клетки и клетки полигональной формы (Рис. 3Б).

Культура аденокарциномы молочной железы (973) отличалась преимущественно суспензионным ростом. Клетки были способны образовывать небольшие шарообразные колонии, которые затем отсоединялись от субстрата и свободно пролиферировали в среде в виде тумороидов (Рис.3З).

Клетки культур меланомы кожи (912, 916, 929) имели округлую и полигональную формы (Рис. 3 Ё, Ж).

Культуры, взятые из биобанка «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова», представляли собой стабильные клеточные линии, которые прошли более 50 пассажей. Скорость образования монослоя составляла 3-4 суток при степени покрытия клетками культурального пластика в 20-30%.

В культуре остеогенной саркомы (793) преимущественно наблюдали вытянутую веретеновидную и фибробластоподобную форму клеток (Рис. 3Г), тогда как в культуре лейомиосаркомы (699) преобладала только фибробластоподобная форма (Рис. 3А).

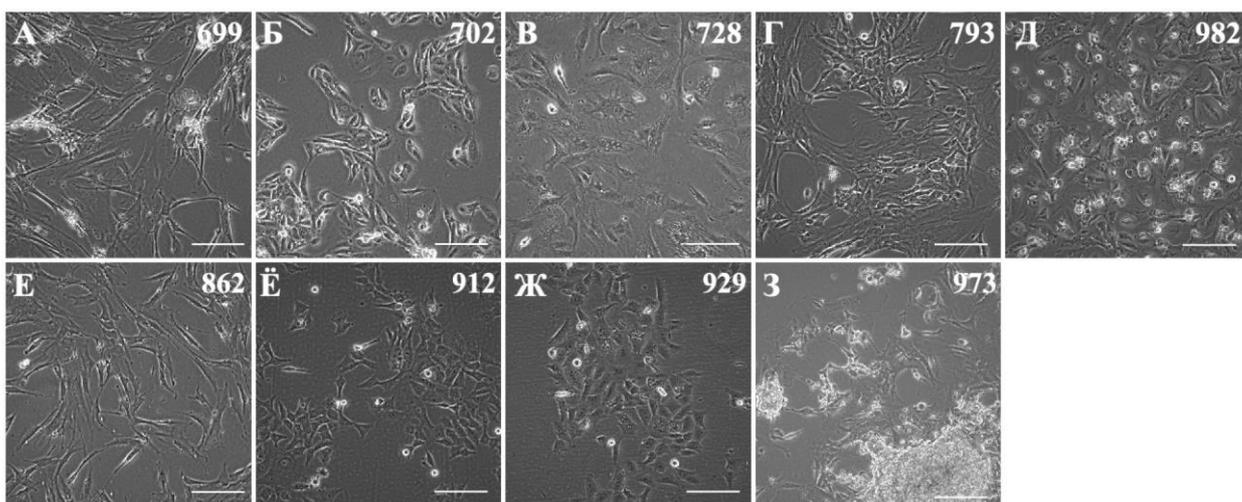


Рисунок 3. Морфология культивируемых опухолевых клеток: А – Лейомиосаркома (699), 20 пассаж.; Б – Плеоморфная липосаркома (702), 18 пассаж.; В – Миксофибросаркома (728), 28 пассаж.; Г – Остеогенная саркома (793); 35 пассаж.; Д – Миксофибросаркома (982), 37 пассаж.; Е – Эмбриональная рабдомиосаркома (862), 27 пассаж.; Ё – Меланома кожи (912), 39 пассаж.; Ж – Меланома кожи (929), 41 пассаж.; З – Аденокарцинома молочной железы (973), 35 пассаж. Автоматизированная аналитическая система Cell-IQ. Размер масштабной линейки 30 мкм.

3.2. Сравнение методов *Hanging drop method* и *Liquid overlay technique* для получения тумороидов

Тумороиды были получены с помощью двух технологий – *Hanging drop method* и *Liquid overlay technique*. Оба метода позволяют получать сфероиды интересующего размера и посевной концентрации. В таблице 4 представлена характеристика тумороидов, полученных этими методами.

За время культивирования наблюдали три стадии формирования тумороидов: 1–2 сутки на дне капли или лунки опухолевые образовывали дискообразные структуры, которые на 3 сутки объединялись в клеточные агрегаты с неровными краями, которые разваливались при любом физическом воздействии. На 4–5 сутки агрегаты набирали клеточную массу и формировали плотный округлый с ровными краями сфероид (Рис. 4).

Время культивирования сфероидов *Hanging drop method* составляло от 3 до 9 дней, тогда как время культивирования методом *Liquid overlay technique* – от 3–12 суток. Большинство культур сфероидов после 10 суток подвергалось распаду. Смена среды в каплях и лунках осуществлялась один раз в трое суток.

Таблица 4. Характеристики тумороидов, полученных с помощью Hanging drop method и Liquid overlay technique.

№ культуры	Технология получения тумороидов											
	Hanging drop method					Liquid overlay technique						
	Агрегация (Да/Нет)	Время культивирования (Сутки)	Количество тумороидов в капле (шт.)	Особенности образования сфероидов	Посевная концентрация в капле	Диаметр сфероидов	Агрегация (Да/Нет)	Время культивирования (Сутки)	Количество тумороидов в лунке (шт.)	Особенности образования сфероидов	Посевная концентрация в лунке	Диаметр сфероидов
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
702	Нет	–	–	отдельные нестабильные агрегаты	До 5000 клеток/каплю	–	Нет	–	–	отдельные нестабильные агрегаты	До 20000 клеток/лунку	–
728	Да	7	1	плотный стабильный тумороид	До 10000 клеток/каплю	До 600 мкм	Да	3	1	плотный стабильный тумороид	До 40000 клеток/лунку	До 700 мкм
862	Да	8	1	плотный стабильный тумороид	До 5000 клеток/каплю	До 300 мкм	Да	4	1	плотный стабильный тумороид	До 40000 клеток/лунку	До 400 мкм
929	Да	4	1	плотный стабильный тумороид	До 10000 клеток/каплю	До 700 мкм	Да	3	От 1 до 6	плотный стабильный тумороид	До 50000 клеток/лунку	До 1000 мкм
973	Да	7	1	неплотный слабостабильный тумороид	До 5000 клеток/каплю	До 500 мкм	Да	3	От 1 до 3	неплотный слабостабильный тумороид	До 20000 клеток/лунку	До 700 мкм
982	Да	6	1	плотный стабильный тумороид	До 5000 клеток/каплю	До 600 мкм	Да	3	1	плотный стабильный тумороид	До 40000 клеток/лунку	До 600 мкм

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
699	Да	От 8 до 9	1	плотный стабильный тумороид	До 10000 клеток/каплю	До 300 мкм	Да	6	1	плотный стабильный тумороид	До 40000 клеток/лунку	До 400 мкм
793	Да	7	1	плотный стабильный тумороид	До 5000 клеток/каплю	До 400 мкм	Да	4	1	плотный стабильный тумороид	До 40000 клеток/лунку	До 600 мкм
912	Да	4	1	плотный стабильный тумороид	До 5000 клеток/каплю	До 500 мкм	Да	3	От 1 до 3	плотный стабильный тумороид	До 50000 клеток/лунку	До 700 мкм
916	Да	4	1	плотный стабильный тумороид	До 5000 клеток/каплю	До 500 мкм	Да	3	1	плотный стабильный тумороид	До 40000 клеток/лунку	До 700 мкм

Удалось получить в 9 случаях 10 клеточных культур опухолевые сфероиды, с которыми в дальнейшем можно было проводить манипуляции. Предел стартовой посевной концентрации почти для всех культур варьировал от 250 до 10000 клеток на каплю и от 250 до 50000 клеток на лунку планшета.

Культура липосаркомы №702 росла в капле и на низкоадгезивной поверхности отдельными агрегатами диаметром до 30 мкм, которые разваливались при смене среды или переносе сфероида (Рис. 4Б).

Было отмечено, что опухолевые сфероиды из культуры меланомы кожи №929 были самыми крупными по диаметру (от 700 до 1000 мкм) и практически не подвергались распаду при длительном культивировании (10–14 дней). Культура №929, как и культура миксофибросаркомы №728 могли образовывать от 3 до 5 сфероидов в одной лунке, которые затем соединялись и образовывали один крупный сфероид (Рис. 4В, Ж).

Культуры эмбриональной рабдомиосаркомы №862 и лейомиосаркомы №699 формировали самые маленькие по диаметру сфероиды – до 300 мкм, культивирование которых занимало от 3–6 суток, после чего опухолюиды распадались (Рис. 4 А, Д).

Культуры меланомы кожи (№912, 916) (Рис. 4 Е, Ё), остеогенной саркомы №793 (Рис. 4 Г), миксофибросаркомы (№728, 982) образовывали плотные компактные сфероиды диаметром до 600 мкм (Рис. 4 В, И).

Получение опухолюидов культуры аденокарциномы молочной железы №973 в заданной стартовой посевной концентрации предоставило ряд трудностей. Поскольку культура имеет преимущественно суспензионный рост, нативные сфероиды предварительно обрабатывали раствором трипсина-версена (1:1), после чего полученную суспензию помещали в каплю или культуральный планшет. Клетки в капле агрегировали на дне в течение 1-2 суток, после чего на 3 сутки среда в капле мутнела и агрегаты распадались. Поэтому для оптимизации методов получения опухолюидов из клеток данной культуры аденокарциномы молочной железы заданной концентрации нативные сфероиды в различных количествах (n=1–4) помещали непосредственно в культуральную жидкость, после чего наблюдали объединение нескольких маленьких сфероидов в один большой (Рис. 4З).

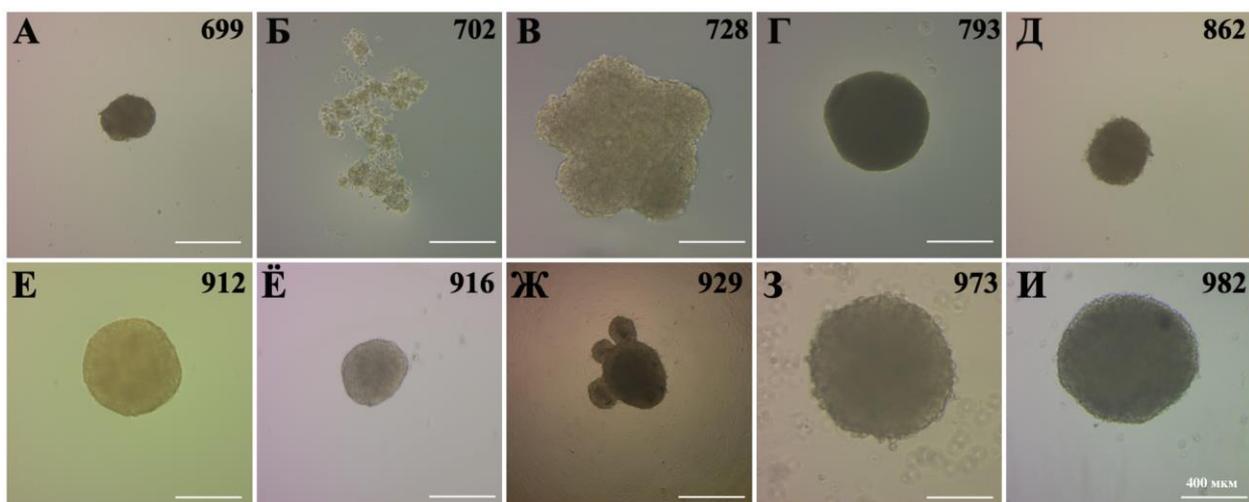


Рисунок 4. Морфология опухолюидов: А – Лейомиосаркома (699), 24 пассаж.; Б – Плеоморфная липосаркома (702), 19 пассаж.; В – Миксофибросаркома (728), 24 пассаж.; Г – Остеогенная саркома (793); 36 пассаж.; Д – Эмбриональная рабдомиосаркома (862), 27 пассаж.; Е – Меланома кожи (912), 33 пассаж.; Ё – Меланома кожи (962), 33 пассаж.; Ж – Меланома кожи (929), 41 пассаж.; З – Аденокарцинома молочной железы (973), 35 пассаж.; И – Миксофибросаркома (982), 34 пассаж. Фазовый контрастный микроскоп Zeiss Primo Vert (10x 0,25 Ph1). Величина масштабной линейки 400 мкм.

Технология Liquid overlay technique продемонстрировала простоту в получении сфероидов, в смене среды в лунках планшета и в проведении манипуляций по фиксации и окраске. Она позволяет получать большое количество сфероидов в кратчайшие сроки. Клетки в планшете подвергаются наименьшему стрессу по сравнению с Hanging drop method. Постоянная смена среды в каплях, отмывка, фиксация сфероидов требует частых переворачиваний крышки чашки Петри, в связи с чем капли зачастую принимали неправильную форму, что, в свою очередь, сказывалось на форме опухолюидов. Также существовал риск потери капель, если сила тяжести быстро сформировавшегося и активно набирающего массу опухолюида превышала силы натяжения капли.

3.3. Визуализация структурных особенностей опухолюидов с помощью конфокальной микроскопии

С помощью конфокальной микроскопии были получены изображения опухолюидов аденокарциномы молочной железы №973, и миксофибросаркомы №728 и лейомиосаркомы №699. Производили окрашивание F-актина с помощью Phalloidin-Alexa-488 и ядерной РНК с помощью Propidium Iodide. Подобная комбинация красителей позволила увидеть структурную организацию опухолюидов, обладающую сходными чертами у различных клеточных культур.

Клетки центральной зоны опухолюидов демонстрировали типичную

мезенхимальную морфологию, характеризующуюся удлинненным клеточным телом и богатую клеточными выростами из F-актина, которые были похожи на филоподии и ламелиподии (Рис. 5).

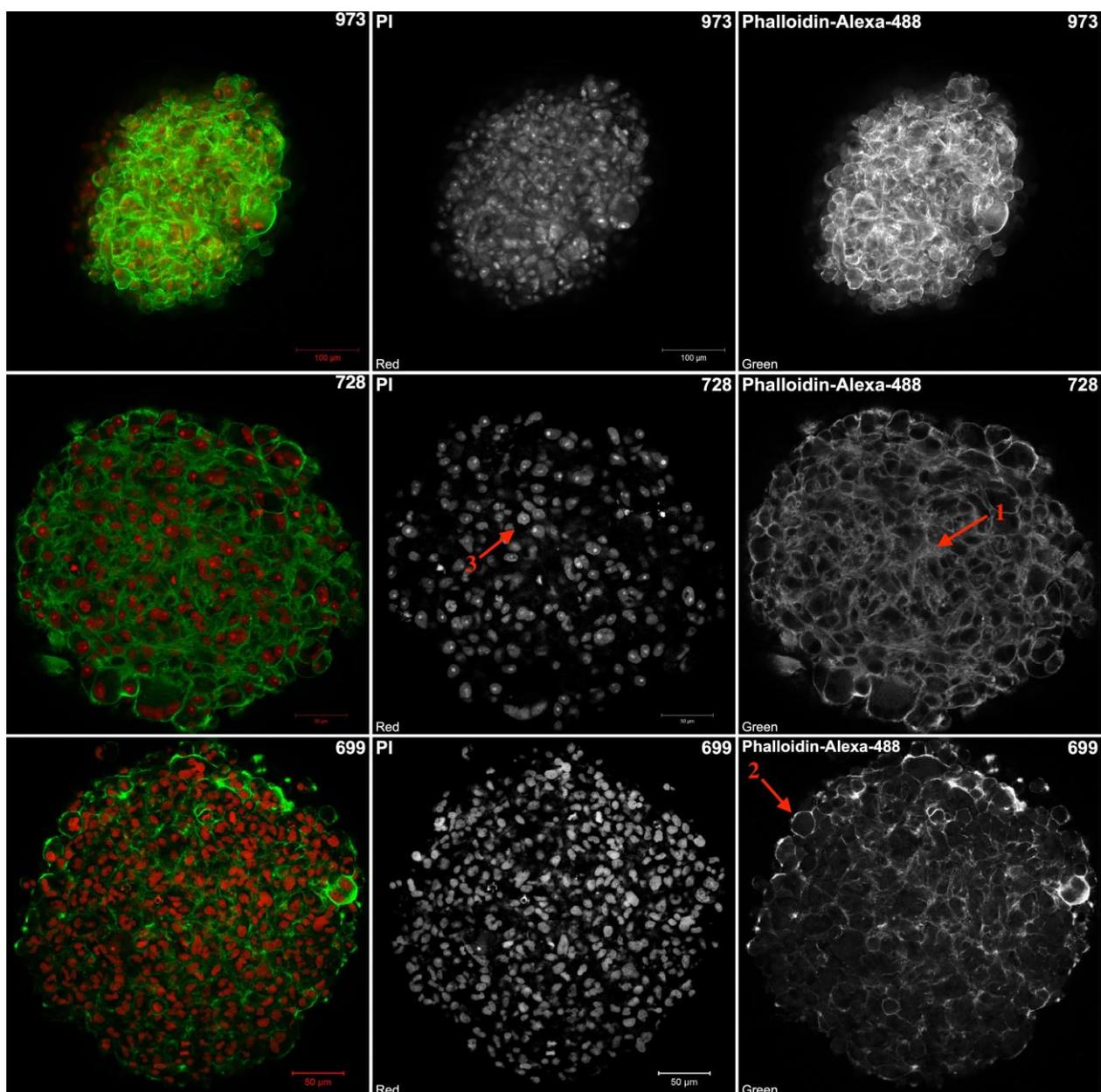


Рисунок 5. Конфокальные изображения опухоридов из клеток аденокарциномы молочной железы (973), и миксофибросаркомы (728) и лейомиосаркомы (699). Окраска PI (красный, ядра) + Phalloidin-Alexa-488 (зелёный, F-актин).

Стрелкой 1 показаны внутренний слой сфероиды и выросты из F-актина, стрелкой 2 – пролиферирующие округлые клетки по периферии сфероиды, стрелкой 3 – окрашенные ядра. Величина масштабной линейки 50 мкм для 699 и 728 клеточных линий, 100 мкм – для 973 клеточной линии.

С помощью программного обеспечения ZEN, которое автоматически преобразует полученные Z-срезы (Z-stacks) в трехмерную проекцию и визуализирует изображения во

всех плоскостях (x-y, x-z и y-z) и под разными углами, удалось проследить подобные выросты по всей глубине опухолей. По периферии располагались преимущественно округлые пролиферирующие клетки без отростков.

3.4. Иммуногисто-/цитохимическое исследование опухолей

Иммунохимический анализ ряда маркеров, ассоциированных с пролиферацией клеток (Ki-67), метаболическими особенностями (однонаправленный белок-переносчик глюкозы – GLUT1) и межклеточными контактами (E-cadherin), был проведен для образцов опухолевой ткани, монослойных культур опухолевых клеток и опухолей каждого пациента. Были исследованы: клетки миксофибросаркомы №728, меланомы кожи №912, меланомы кожи №929, аденокарциномы молочной железы №973, миксофибросаркомы №982. В каждом случае готовили парафиновые срезы опухолей (n=4), послеоперационного опухолевого материала (n=4) и зафиксированные ацетоном монослойные культуры (n=4).

Для общей визуализации объектов производили окрашивание препаратов с помощью гематоксилина Майера и эозина. В монослой культивируемые опухолевые клетки были хорошо распластаны и занимали значительную площадь. Структура опухолей и опухолевой ткани в значительной мере совпадала. Клетки, сфероидов особенно по периферии, были округлой формы, а в толще сфероида имели вид компактных структур, поскольку пространство было органичено соседними клетками и внеклеточным матриксом (Рис. 6-8, 10).

Было обнаружено различия в экспрессии маркера пролиферации Ki-67 между клетками монослойных культур, сфероидов и опухолевой ткани (Рис. 6, 8, 10). Количество Ki67⁺ клеток в сфероидах и опухолевой ткани превышало таковое в монослойных культурах. Можно предполагать, что наличие более сложной по сравнению с монослойными культурами архитектуры опухолевого сфероида, а также наличие градиента питательных веществ внутри него повышает экспрессию этого фактора. Кроме того, наблюдали в сфероидах как периферийную локализацию Ki67⁺ клеток так и диффузную по всей толще опухоли (Рис. 6, 7, 8-10).

Повышенная гипоксия в опухолевой ткани индуцирует экспрессию GLUT-1, который осуществляет однонаправленный перенос глюкозы через плазматическую мембрану. Экспрессия опухолевыми клетками GLUT-1 была отмечена в опухолях и сфероидах. Во всех образцах монослойных культур не наблюдали экспрессию этого белка. Было также отмечено градиентное распределение GLUT-1 как в сфероидах, так и в опухолевой ткани (Рис. 6, 7).

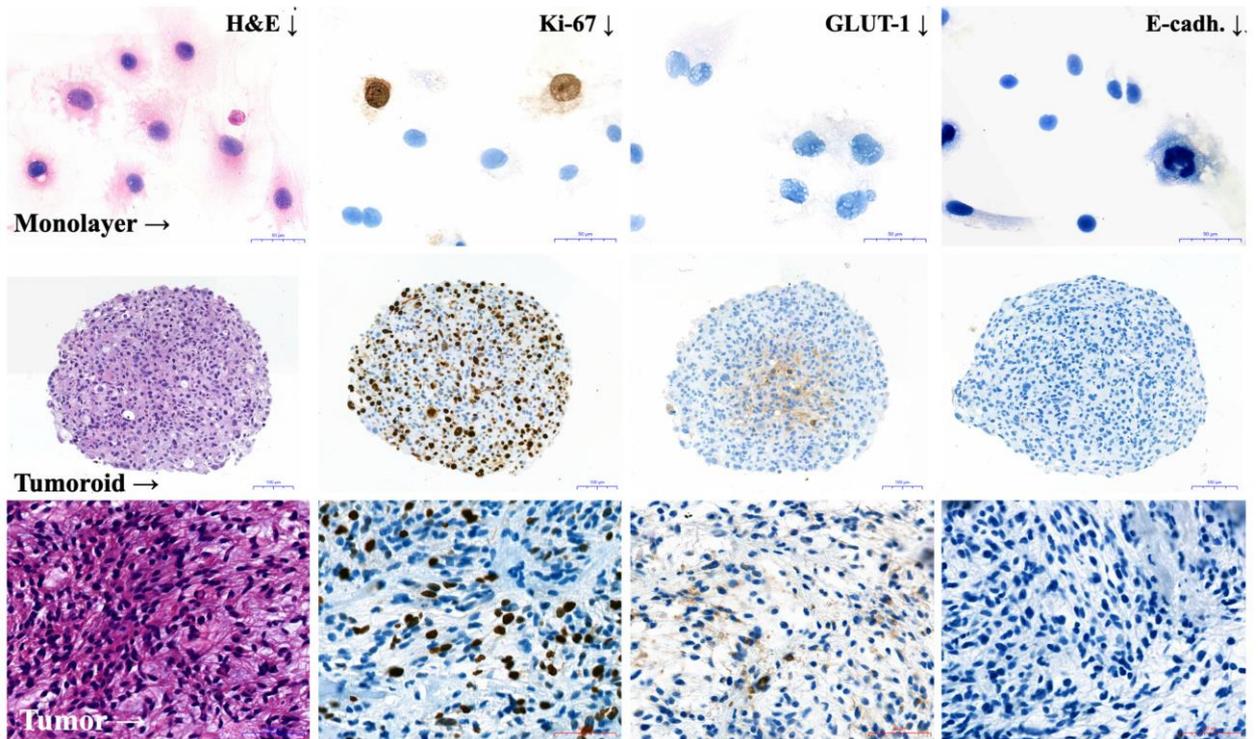


Рисунок 6. Идентификация Ki-67, GLUT1, E-cadherin методом иммуногисто-/цитохимии в клетках миксофибросаркомы №728 2D-систем (монослой), масштабная линейка 50мкм; 3D-систем (тумороиды), масштабная линейка 100мкм; операционного опухолевого материала, масштабная линейка 50 мкм.

Слева направо: окраска гематоксилин-эозином; маркер пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67; GLUT1 — однонаправленный белок-переносчик глюкозы; белок клеточной адгезии E-cadherin.

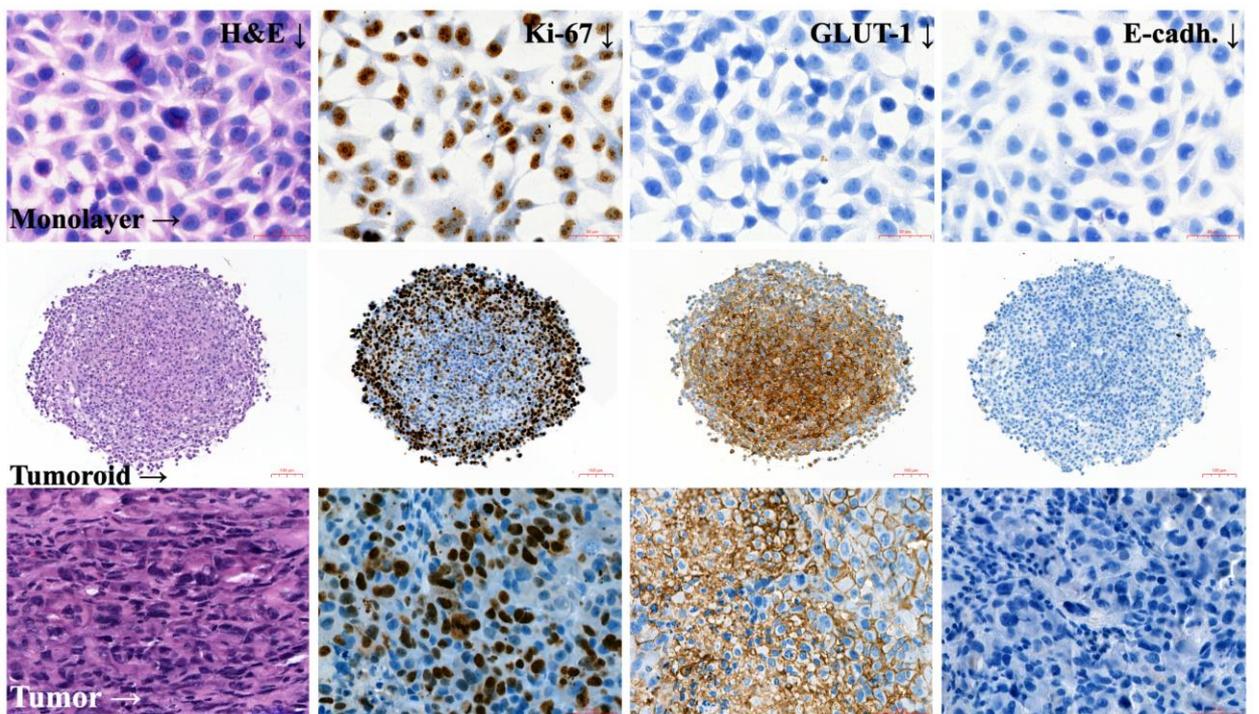


Рисунок 7. Идентификация Ki-67, GLUT1, E-cadherin методом иммуногисто-/цитохимии в клетках меланомы кожи №912 2D-систем (монослой), масштабная линейка 50 мкм; 3D-систем (тумороиды), масштабная линейка 100мкм; операционного опухолевого материала, масштабная линейка 50 мкм.

Слева направо: окраска гематоксилин-эозином; маркер пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67; GLUT1 — однонаправленный белок-переносчик глюкозы; белок клеточной адгезии E-cadherin.

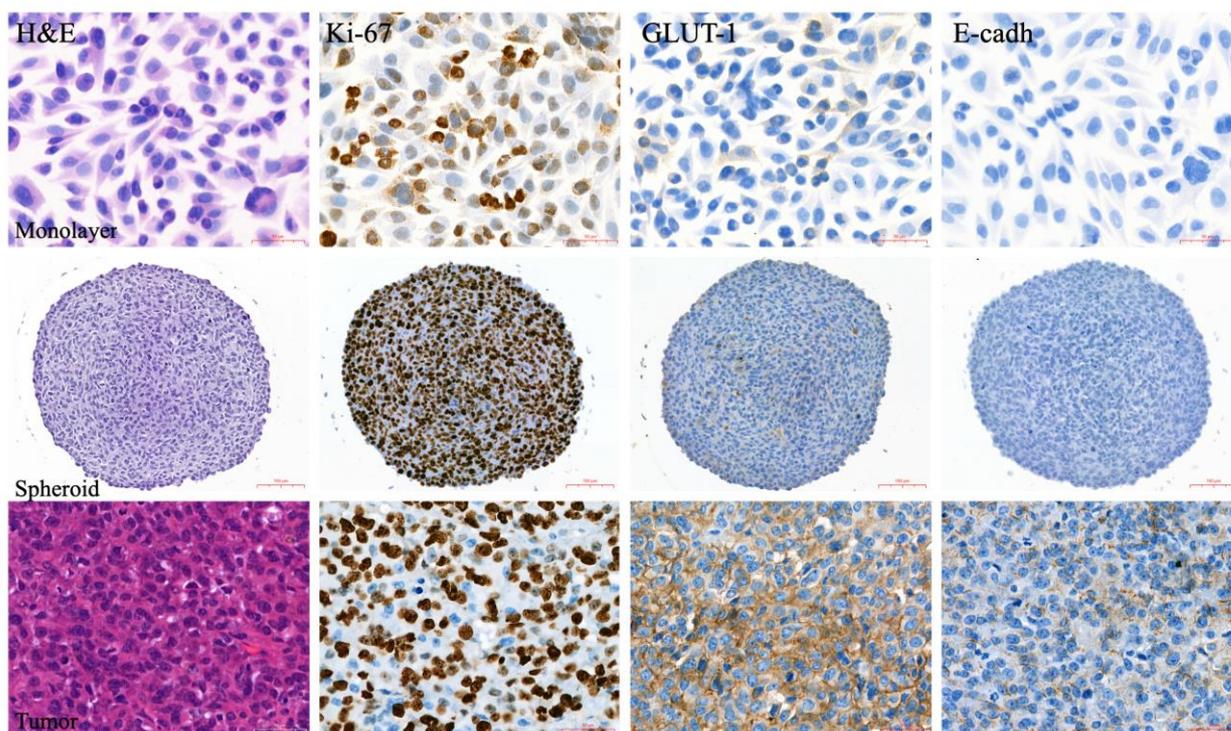


Рисунок 8. Идентификация Ki-67, GLUT1, E-cadherin методом иммуногисто-/цитохимии в клетках меланомы кожи №929 2D-систем (монослой), масштабная линейка 50 мкм; 3D-систем (тумороиды), масштабная линейка 100 мкм; операционного опухолевого материала, масштабная линейка 50 мкм.

Слева направо: окраска гематоксилин-эозином; маркер пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67; GLUT1 — однонаправленный белок-переносчик глюкозы; белок клеточной адгезии E-cadherin.

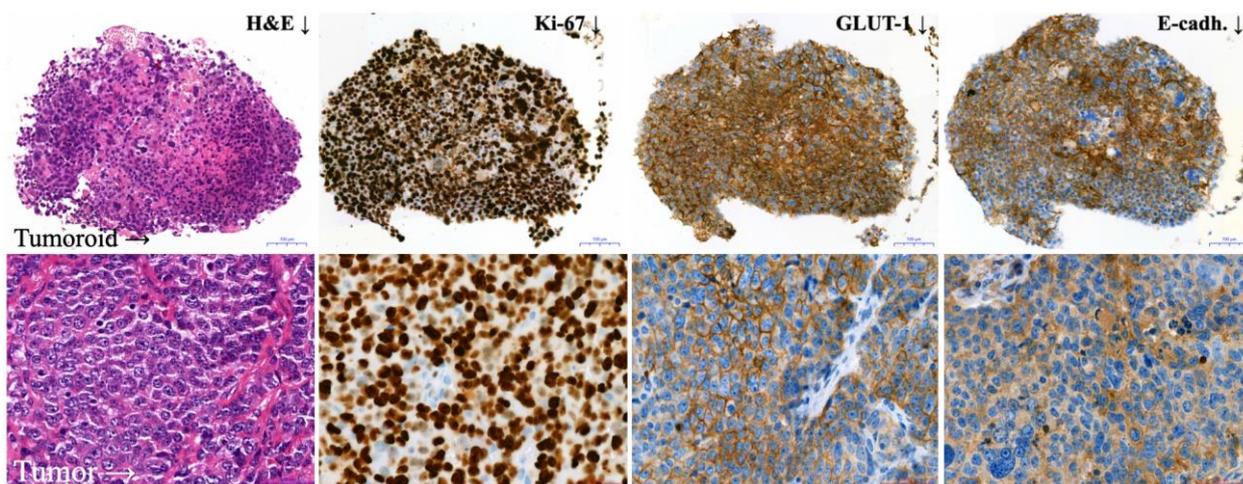


Рисунок 9. Идентификация Ki-67, GLUT1, E-cadherin методом иммуногисто-/цитохимии в клетках аденокарциномы молочной железы №973 3D-систем (тумороиды), масштабная линейка 100 мкм, и операционного опухолевого материала, масштабная линейка 50 мкм.

Слева направо: окраска гематоксилин-эозином; маркер пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67; GLUT1 — однонаправленный белок-переносчик глюкозы; белок клеточной адгезии E-cadherin.

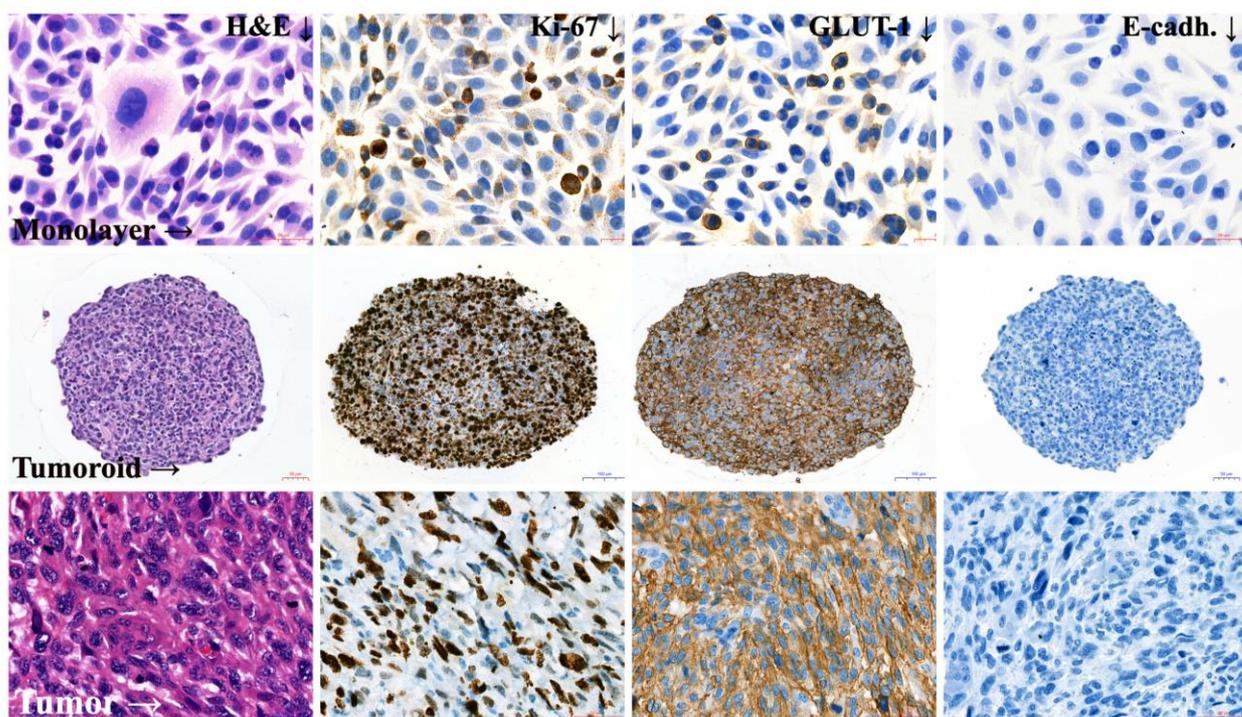


Рисунок 10. Идентификация Ki-67, GLUT1, E-cadherin методом иммуногисто-/цитохимии в клетках миксофибросаркомы №982 2D-систем (монослой), масштабная линейка 50 мкм; 3D-систем (тумороиды), масштабная линейка 50 мкм; операционного опухолевого материала, масштабная линейка 50 мкм.

Слева направо: окраска гематоксилин-эозином; маркер пролиферативной активности опухолевых клеток Ki-67; GLUT1 — однонаправленный белок-переносчик глюкозы; белок клеточной адгезии E-cadherin.

Интенсивность экспрессии GLUT-1, оцениваемая по интенсивности иммуноцитохимической реакции, зависела от размера сфероиды: чем больше размер – тем более выраженное окрашивание. Центр опухолевого сфероида, сформированного из меланомы кожи №912, был окрашен ярко, к периферии интенсивность окраски уменьшалась (Рис. 7). Подобное распределение количества GLUT-1 может свидетельствовать об уменьшении концентрации глюкозы от периферии к центру опухолевого сфероида. Повышенная экспрессия GLUT-1 в опухолевых сфероидах наглядно демонстрирует изменение метаболизма глюкозы опухолевых клеток, культивируемых в 3D-системах по сравнению с 2D-системами.

Для исследования инвазивных потенций опухолевых клеток в контексте мезенхимально-эпителиального перехода было произведено иммуногистохимическое исследование молекул клеточной адгезии – E-cadherin. E-cadherin экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток, способствуя образованию плотных контактов между клетками. Опухолевые клетки, утратившие этот белок, проявляют потенцию к инвазии и метастазированию.

E-cadherin был выявлен в опухолевых сфероидах, сформированных из клеточной культуры

аднокарциномы молочной железы №973, так же как в ткани самой опухоли, из которой была получена культура (Рис. 9). В данном случае высокая экспрессия E-cadherin объясняется эпителиальной природой происхождения культуры клеток. В ткани опухоли меланомы кожи №912 также обнаруживался E-cadherin, тогда как монослойная культура и тумороид его не экспрессировали. В остальных образцах E-cadherin не был выявлен.

Таким образом, иммуногисто-/цитохимическое исследование опухолевой ткани разных гистологических типов, монослойной культуры и сфероидов продемонстрировало сходство структуры сфероидов и исходной опухолевой ткани. В тумороидах была обнаружена зональность распределения Ki-67 и GLUT-1. Оно наглядно иллюстрирует представления о существующем градиенте веществ и пролиферации в тумороиде, который изначально присутствует в многоклеточной опухоли.

3.5. Сравнительная оценка альдегиддегидрогеназной активности в 2D- и 3D-системах с помощью проточной цитофлуориметрии

Для оценки ALDH-активности опухолевых клеток, культивируемых в 3D- и 2D-системах были взяты клеточные культуры миксофибросаркомы №728 и №982 и лейомиосаркомы №699.

Клеточная культура миксофибросаркомы №982 была позитивна по ALDH, относительное содержание ALDH⁺клеток в популяции составило 43,2% при монослойном способе культивирования и 44,6% в сфероидах.

Клетки культуры миксофибросаркомы №728, напротив, слабо продуцировали ALDH, позитивная по этому маркеру субпопуляция составила от 1 до 1,5%, при этом не наблюдали различий между клетками опухолевых сфероидов и монослойными культурами.

Таким образом, не было получено существенных различий по продукции ALDH культурами опухолевых клеток в зависимости от формата культивирования (рис.11). Возможно, для формирования пула ALDH-позитивных опухолевых клеток внутри тумороида необходимо создание опухолевого микроокружения путём кокультивирования опухолевых клеток со стромальными элементами и клетками иммунной системы.

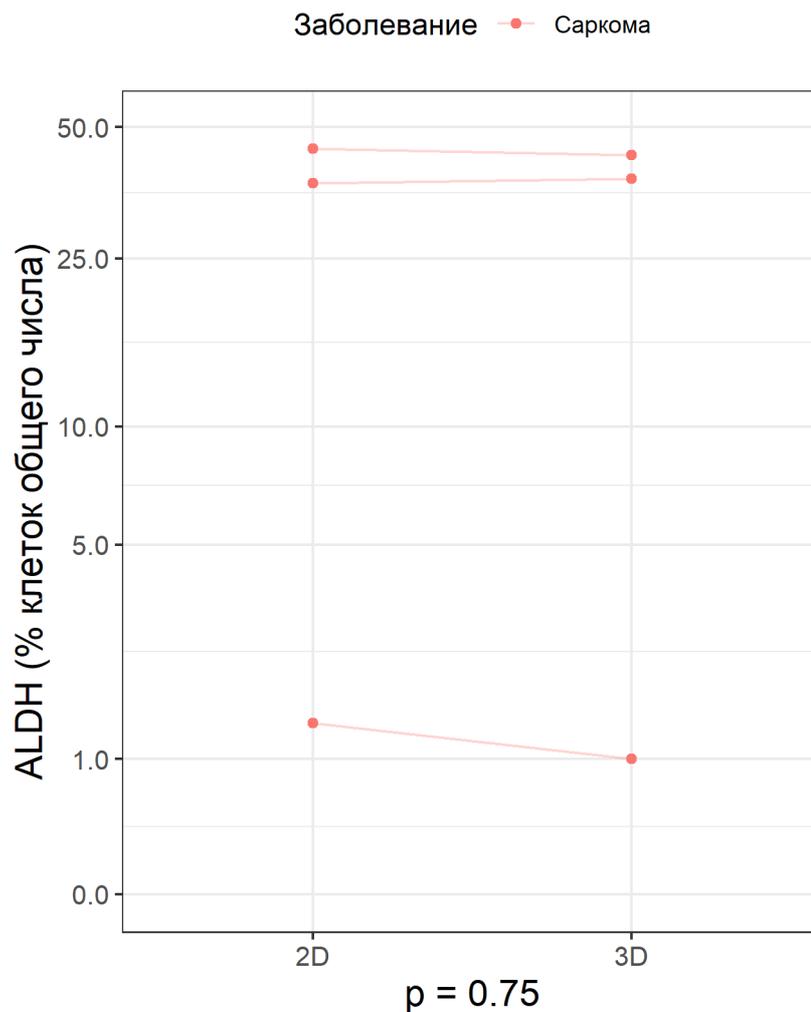


Рисунок 11. Графическое изображение индивидуальных различий в продукции альдегиддегидрогеназы (ALDH) клетками солидных опухолей, культивируемых в системах 2D и 3D. По оси абсцисс: условия культивирования, по оси ординат: % опухолевых клеток, продуцирующих ALDH.

3.6. Оценка продукции цитокинов и хемокинов 2D- и 3D-системами с помощью мультиплексного анализа

Важная составляющая опухолевого микроокружения – определенная концентрация цитокинов и хемокинов, которые способствуют привлечению клеток иммунной системы из периферической крови в опухолевый очаг, развитию воспаления, подавлению цитотоксической активности иммунных клеток. Повышенная секреция подобных факторов опухолевыми клетками коррелирует с плохим прогнозом лечения и подавлением специфического противоопухолевого иммунного ответа.

В исследовании были использованы 8 культур опухолевых клеток: меланомы кожи (№929, 912, 916), лейомиосаркомы №699, остеосаркомы №793, миксофибросаркомы №728, 982, эмбриональной рабдомиосаркомы №862.

Опухолевые клетки, растущие в монослойной культуре, продуцировали меньше CXCL16: 112,51 (0,81 – 151,47) пг/мл по сравнению с клетками в составе тумороидов: 9,54 (3,23– 177,51) пг/мл; $p=0,9453125$ (Рис. 12Д).

Наблюдала статистически значимое увеличение продукции IL-10 в 3D культуре по сравнению с монослоем: медиана 252,86 (минимум 41,13 – максимум 502,77) пг/мл и 41,76 (9,10 – 172,15) пг/мл; $p=0,0078125$, соответственно (Рис. 12В).

Также выявлено увеличение уровня CCL2 в кондиционированной среде сфероидов: 2531,59 (165,79 – 6316,8) пг/мл, в то время как в супернатанте монослойных культур концентрация составила 2065,10 (13,14 – 7338,51) пг/мл; $p=0,9453125$ (Рис. 12А).

Показано различие концентрации хемокина CCL3: 1,98 (0,48 – 14,89) пг/мл по сравнению с 2,82 (1,17 – 1230,28) пг/мл в монослое и тумороидах, соответственно ($p=0,3125$) (Рис. 12Г).

Секреция MIF также изменялась в зависимости от условий культивирования: 57327,61 (3084,26 – 129066,34) пг/мл в 2D культурах до 66650,24 (41560,01 – 525731,21) пг/мл в сфероидах ($p=0,3828125$) (Рис. 12Е).

Концентрация CXCL12 в супернатантах 2D культур опухолевых клеток составляла 523,72 (30,81 – 238,02) пг/мл, в то время как тумороиды продуцировали меньшее количество этого хемокина: 91,865 (14,06 – 6454,81) пг/мл; $p=1$ (Рис. 12Б).

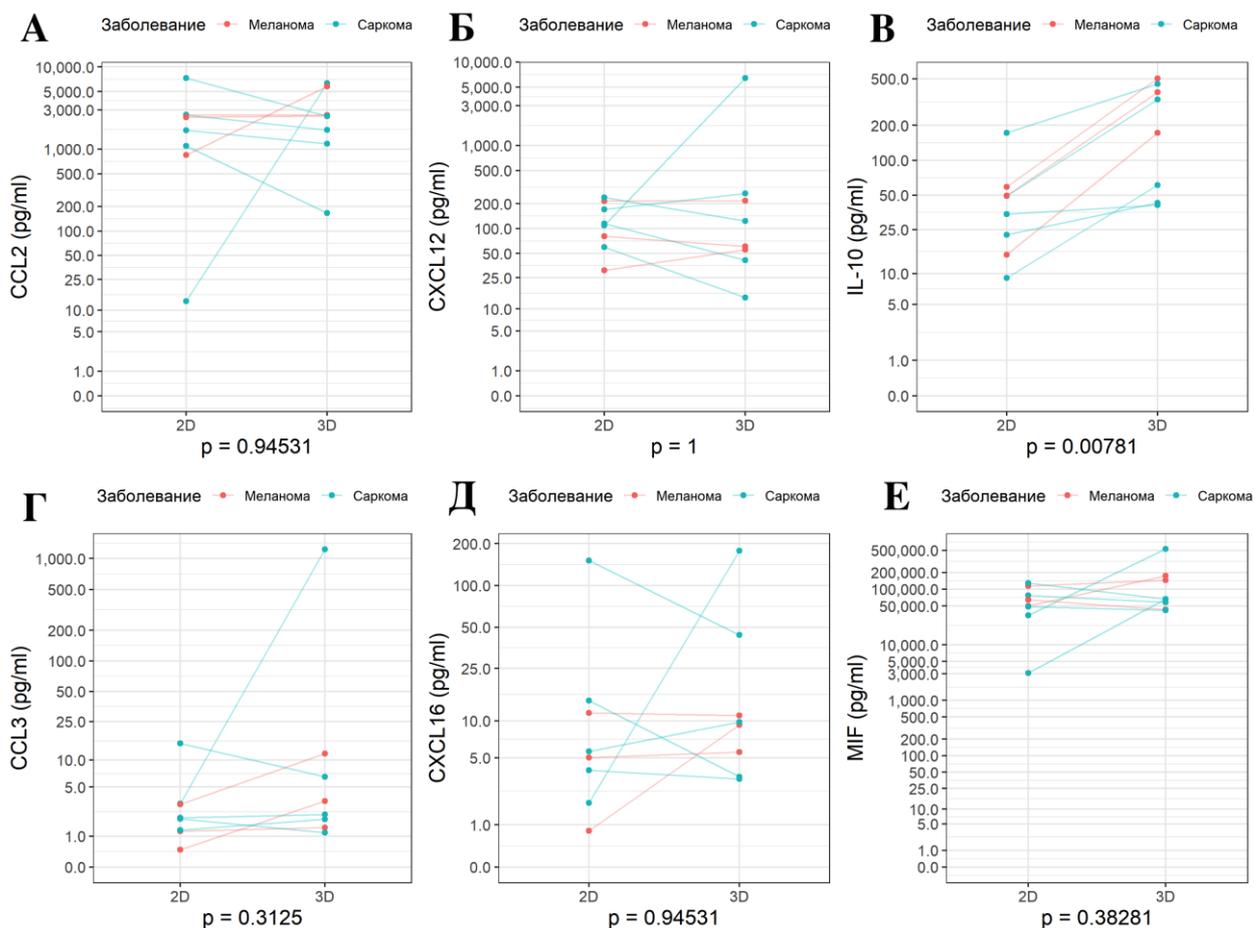


Рисунок 12. Графическое изображение индивидуальных различий в продукции цитокинов и хемокинов клетками солидных опухолей, культивируемых в системах 2D и 3D: А – хемокина MCP-1/CCL2 в супернатантах монослойных культур и опухолей; Б – хемокина SDF-1/CXCL12; В – цитокина IL-10; Г – хемокина MIP-1a/CCL3; Д – хемокина SCYB16/CXCL16; Е – фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF). По оси абсцисс: условия культивирования, по оси ординат: концентрация исследуемого вещества в супернатантах культур опухолевых клеток, пг/мл.

Было отмечено, что опухоли миксофибросаркомы №728 продуцируют значительно большее количество всех вышеописанных факторов по сравнению с монослойными культурами. Например, продукция CXCL12 увеличивалась с 109,45 пг/мл в монослой до 6454,81 пг/мл в опухолях. Продукция фактора MIF - с 3084,26 пг/мл (монослой) до 66351,41 пг/мл (опухоли). Продукция CCL2 - с 13,13 пг/мл (монослой) до 6316,8 пг/мл (опухоли).

3.7. Иммуноферментный анализ продукции иммуносупрессирующих факторов МІСА и TGF-β 2D- и 3D-клеточными системами

С помощью ИФА выявляли продукцию иммуносупрессирующих факторов МІСА и

трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1) в 2D- и 3D-системах опухолевых культур (n=9): эмбриональной рабдомиосаркомы №862, миксофибросаркомы №728, 982, лейомиосаркомы №699, меланомы кожи №912, 916, 929, остеогенной саркомы №793 и аденокарциномы молочной железы №973.

– в обсуждение

Наблюдали статистически значимое увеличение продукции MICA в 3D культуре: 225,74 (58,88–773,52) пг/мл по сравнению с монослоем: 79,37 (24,48–558,53) пг/мл; $p=0,00391$ (Рис. 13А).

Статистически значимого увеличения продукции TGF-β в 3D культуре по сравнению с монослоем для всех типов опухолей не наблюдали: 2,111 (0,948–3,824) нг/мл для сфероидов против 2,918 (0,698–5,57) нг/мл для монослойного варианта культивирования, $p=0,1641$ (Рис. 13Б).

Однако при индивидуальном анализе было обнаружено, что продукция TGF-β1 увеличивалась в 3D-культуре лейомиосаркомы №699 в два раза по сравнению с 2D-культурой (1,5340 нг/мл и 0,6980 нг/мл, соответственно). Аналогичная тенденция была выявлена для клеток меланомы кожи №912 – тумороиды/монослой 3,8240 нг/мл и 2,4700 нг/мл, соответственно.

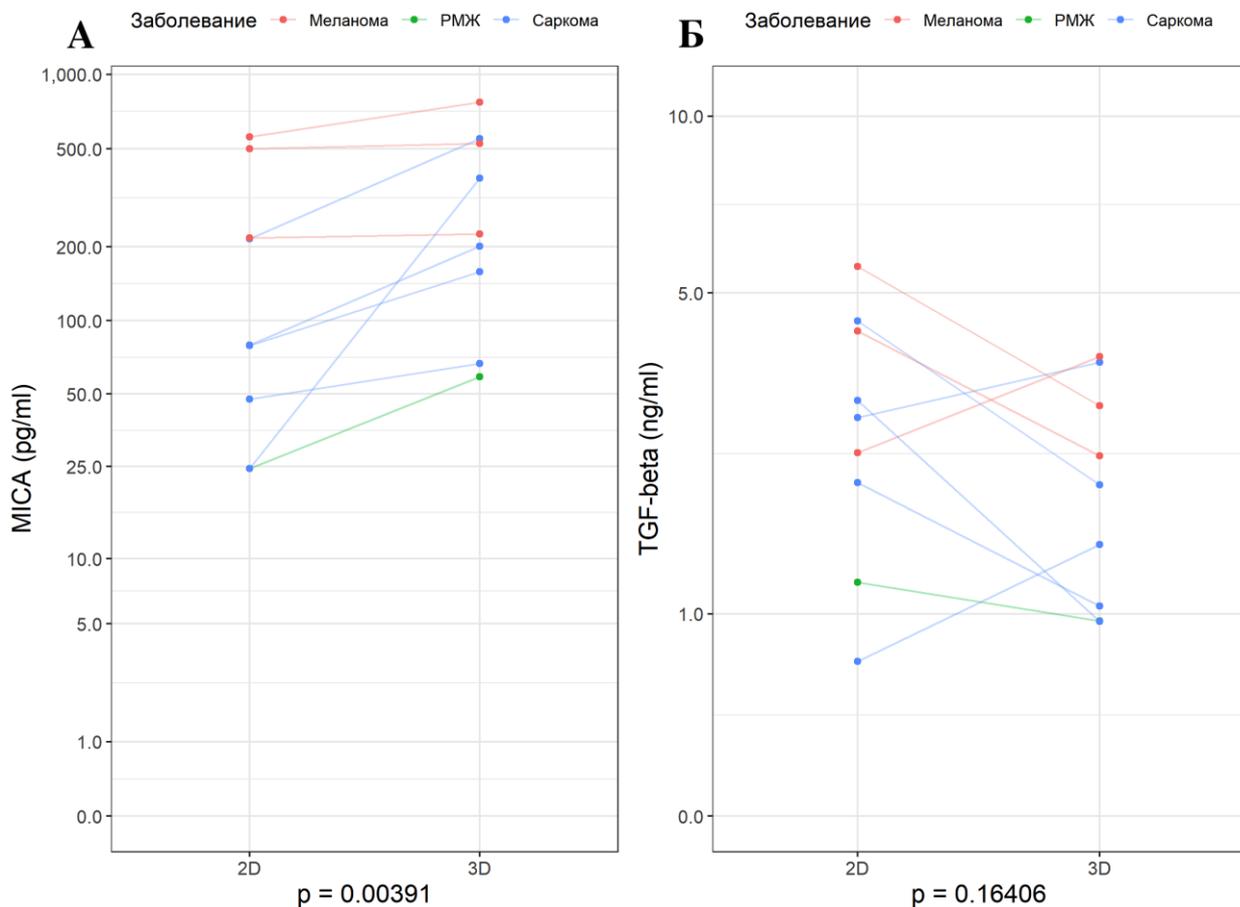


Рисунок 13. Графическое изображение индивидуальных различий в продукции иммуносупрессирующих факторов МІСА и TGF-β клетками солидных опухолей, культивируемых в системах 2D и 3D: А – лиганда активационного рецептора NKG2D цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток (MICA); Б – трансформирующего ростового фактора TGF-β. По оси абсцисс: условия культивирования, по оси ординат: концентрация исследуемого вещества в супернатантах культур опухолевых клеток, пг/мл (для MICA) и нг/мл (для TGF-β).

3.8. Оценка цитотоксического действия химиопрепаратов на 2D- и 3D-системы с помощью МТТ-теста

Для исследования цитотоксического действия химиопрепаратов использовали культуры опухолевых клеток, культивируемые в 2D- и 3D-системах: эмбриональной рабдомиосаркомы №862, миксофибросаркомы №728 и №982, меланомы кожи №929 и аденокарцинома молочной железы №973 (n=5).

Подбор различных химиотерапевтических агентов и их комбинации, применяемых в клинике, осуществлялся на основе ретроспективного лечения пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Комбинации протестированных химиопрепаратов представлены в таблице 1.

Для оценки химиорезистентности опухолевых клеток был использован МТТ-тест. Для постановки МТТ-теста были применены 2 концентрации химиопрепаратов: терапевтическая (соответствующая 10% от пиковой концентрации в плазме) и десятикратно превышающая терапевтическую (соответствующая пику концентрации в плазме – 100%).

Для культуры миксофибросаркомы №728 были подобраны препаратов: паклитаксел (100% – 2,17 мкг/мл; 10% – 0,217 мкг/мл) и комбинация доксорубицин+ифосфамид (100% – 1 мкг/мл + 440 мкг/мл; 10% – 0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл).

Культивирование культуры миксофибросаркомы в 2D- и 3D-системах в среде с паклитакселом почти не влияло на процент жизнеспособности опухолевых клеток: при добавлении в среду пиковой концентрации препарата наблюдали снижение жизнеспособности на 8%, тогда как добавление в среду терапевтической дозы препарата приводило к снижению жизнеспособности монослойных культур на 12,3%, а у сфероидов на 14,4% (Рис. 14).

Выраженный цитотоксический эффект наблюдали в монослойных культурах при добавлении в среду комбинации доксорубицин+ифосфамид (1 мкг/мл + 440 мкг/мл). Количество жизнеспособных клеток составляло всего 27%, тогда как при добавлении в среду терапевтической дозы доксорубицин+ифосфамид (0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл)

наблюдали 34% жизнеспособных клеток.

Снижение жизнеспособности на 21% наблюдали при добавлении в среду к опухолевым сфероидам комбинации доксорубицин+ифосфамид (1 мкг/мл + 440 мкг/мл). Терапевтическая доза этой же комбинации приводила к снижению жизнеспособности опухолевых клеток на 19% (Рис. 14).

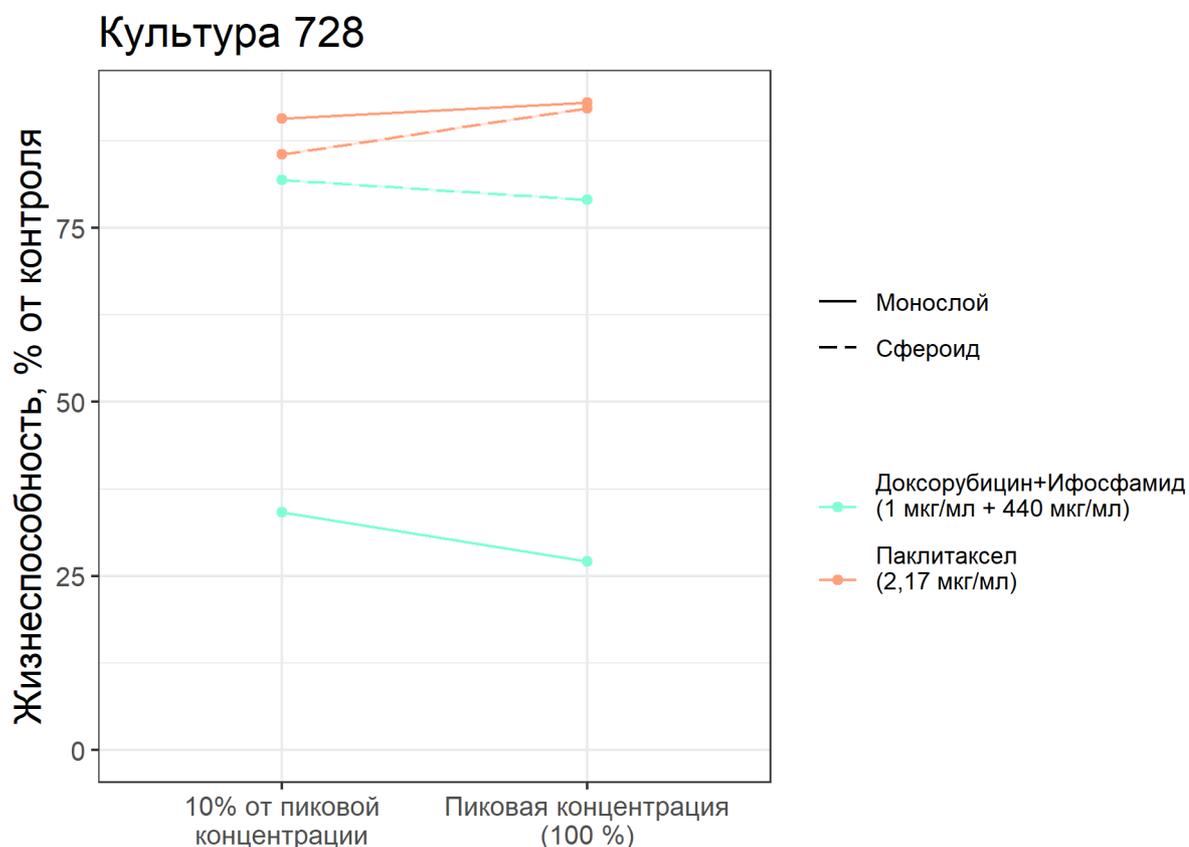


Рисунок 14. Графическое изображение индивидуальных различий в химиочувствительности к препаратам паклитаксел и доксорубицин+ифосфамид клетками миксофибросаркомы №728, культивируемых в системах 2D и 3D.

Тумороиды миксофибросаркомы №728 продемонстрировали химиорезистентность к комбинации препаратов доксорубицин+ифосфамид по сравнению с монослойными культурами. В клинике на фоне применения данной комбинации у пациента П. наблюдали стабилизацию опухолевого заболевания, однако опухолевый материал, послуживший источником для создания клеточной линии №728, был изъят из организма больного после проведенного лечения.

Для лечения пациента С. с меланомой кожи применяли BRAF- и MEK-ингибиторы, ниволумаб; комбинацию паклитаксел+карбоплатин. На фоне лечения наблюдали быстрое прогрессирование заболевания. В связи с этим для клеток меланомы кожи №929 были подобраны препараты: паклитаксел (100% – 2,17 мкг/мл; 10% – 0,217 мкг/мл) и цисплатин

(100% – 3 мкг/мл; 10% – 0,3 мкг/мл). Цисплатин использовали в эксперименте вместо кабоплатина, поскольку препараты являются аналогами. Ко всем подобранным комбинациям химиопрепаратов наблюдали химиорезистентность: при культивировании цисплатина в терапевтической дозе (10% – 0,3 мкг/мл) со сфероидами наблюдали 90% живых клеток, в монослоях – 92,6%. Добавление в среду пиковой концентрации цисплатина (3 мкг/мл) также не приводило к значительному уменьшению живых клеток: в опухолях жизнеспособность клеток уменьшилась на 9%, в монослоях – на 14% (Рис. 15). Паклитаксел стимулировал пролиферацию клеток культуры меланомы кожи №929: присутствие в среде пиковой концентрации препарата (2,17 мкг/мл) увеличивало количество жизнеспособных клеток в опухолях (123,4%) и в монослоях (137%). Терапевтическая доза паклитаксела (0,217 мкг/мл) почти не уменьшала жизнеспособность монослойных культур (98%), но индуцировала пролиферацию клеток опухолевого сфероида (108,3%) (Рис. 15).

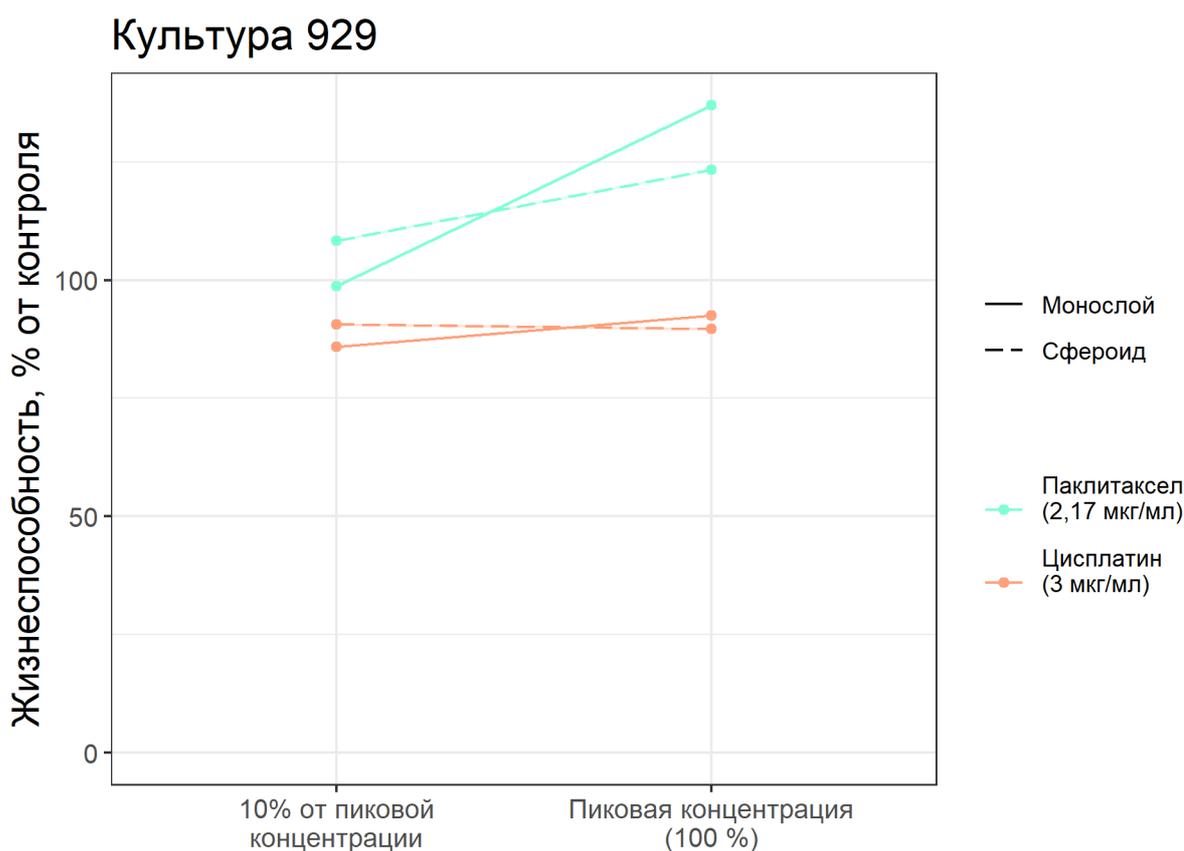


Рисунок 15. Графическое изображение индивидуальных различий в химиочувствительности на препараты паклитаксел и доксорубицин+ифосфамид клетками меланомы кожи №929, культивируемых в системах 2D и 3D.

Лечение эмбриональной рабдомиосаркомы пациента К. производили с помощью следующих комбинаций: винкристин + ифосфамид + этопозид; винкристин+ карбоплатин + эпирубицин; винкристин + топотекан + циклофосфамид. На фоне линий химиотерапии наблюдали частичный регресс опухолевого очага.

Для культуры эмбриональной рабдомиосаркомы №862 были подобраны препараты: паклитаксел (100% – 2,17 мкг/мл; 10% – 0,217 мкг/мл) и комбинация доксорубицин+ифосфамид (100% – 1 мкг/мл + 440 мкг/мл; 10% – 0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл). Доксорубицин был выбран в качестве аналога эпирубицина (рис.16).

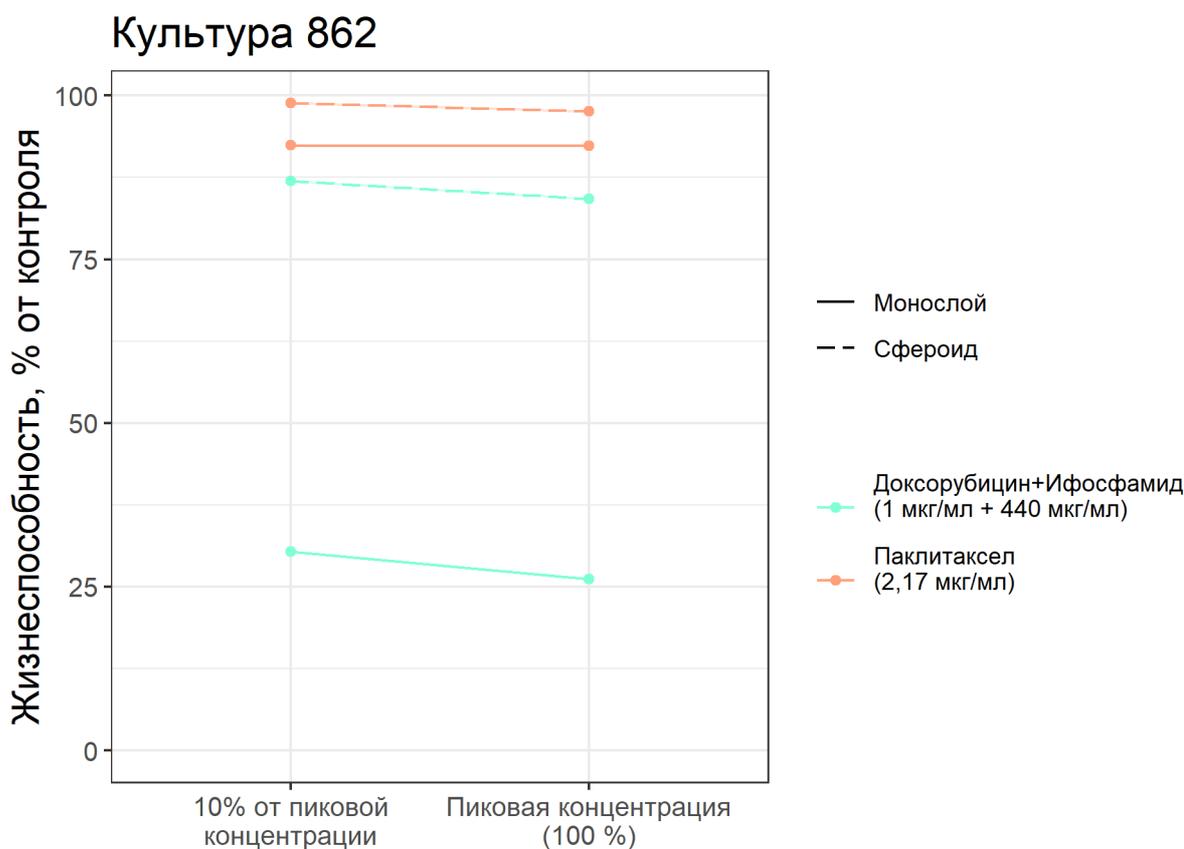


Рисунок 16. Графическое изображение индивидуальных различий в химиочувствительности на препараты паклитаксел и доксорубицин+ифосфамид клетками эмбриональной рабдомиосаркомы №862, культивируемых в системах 2D и 3D.

Паклитаксел почти не влиял на процент жизнеспособных клеток: присутствие в среде пиковой концентрации препарата (2,17 мкг/мл) уменьшало жизнеспособность опухолюидов на 27%, монослойных культур – на 21%. Терапевтическая доза паклитаксела (0,217 мкг/мл) уменьшала жизнеспособность монослойных культур на 20%, но не изменяла количество живых клеток (98%). Была обнаружена химиочувствительность к комбинации доксорубицин+ифосфамид в 2D- и 3D-системах. При добавлении пиковой

концентрации данной комбинации препаратов (1 мкг/мл + 440 мкг/мл) наблюдали уменьшение жизнеспособности опухолевых сфероидов на 17%, тогда как в монослоях количество живых клеток после инкубации составляло 59,5%. Химиочувствительность прослеживали и при культивировании клеток в среде с терапевтической дозой препарата (0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл): жизнеспособность сфероидов составляла 83,2%, монослоев – 75,9% (Рис. 16). Подобный клеточный ответ на комбинацию доксорубицин+ифосфамид соотносится с клиническим течением заболевания в ответ на комбинацию противоопухолевых препаратов.

На фоне терапии аденокарциномы молочной железы пациентки К. комбинациями доксорубицин+циклофосфамид; доцетаксел+карбоплатин; эрибулин+капецитабин во время терапии в клинике наблюдали активное прогрессирование заболевания.

Исходя из ретроспективного лечения этого вида злокачественного новообразования, для культуры аденокарциномы молочной железы №973 были подобраны препараты: паклитаксел (100% – 2,17 мкг/мл; 10% – 0,217 мкг/мл) и комбинация доксорубицин+ифосфамид (100% – 1 мкг/мл + 440 мкг/мл; 10% – 0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл). Паклитаксел и доцетаксел проявляют сходные химиотерапевтические эффекты, поскольку относятся к одной группе химиопрепаратов – таксаны.

Поскольку клеточная культура имеет преимущественно суспензионный сфероидальный рост, в исследование были взяты только опухолевые сфероиды.

В опухолях аденокарциномы молочной железы наблюдали химиочувствительность к двум комбинациям химиопрепаратов: для пиковой концентрации паклитаксела (2,17 мкг/мл) и доксорубицин+ифосфамид (1 мкг/мл) наблюдали снижение жизнеспособности опухолевых клеток на 36 и 42%, соответственно. При добавлении в культуральную среду терапевтических доз паклитаксела (0,217 мкг/мл) и комбинации доксорубицин+ифосфамид (0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл) отметили снижение живых клеток на 20,5 и 25%, соответственно (Рис. 17).

Лечение миксофибросаркомы пациента А. производили комбинациями: доксорубицин+ифосфамид; гемцитабин+доцетаксел. На фоне линий химиотерапии наблюдали прогрессирование опухолевого заболевания.

Исходя из ретроспективного лечения для клеток культуры миксофибросаркомы №982 были подобраны препараты: паклитаксел (100% – 2,17 мкг/мл; 10% – 0,217 мкг/мл) и комбинация доксорубицин+ифосфамид (100% – 1 мкг/мл + 440 мкг/мл; 10% – 0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл).

Тумороиды миксофибросаркомы продемонстрировали одинаковый ответ на комбинацию доксорубицин+ифосфамид в двух комбинациях (1 мкг/мл + 440 мкг/мл; 0,1

мкг/мл + 44 мкг/мл). Количество жизнеспособных клеток составляло 83 и 83,5%, соответственно. Максимальный цитотоксический эффект комбинации доксорубицин+ифосфамид наблюдали в монослойных культурах: на добавление пиковой концентрации (1 мкг/мл + 440 мкг/мл) – 59,5% жизнеспособных клеток и на терапевтическую дозу (0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл) – 79,5% (Рис. 18).

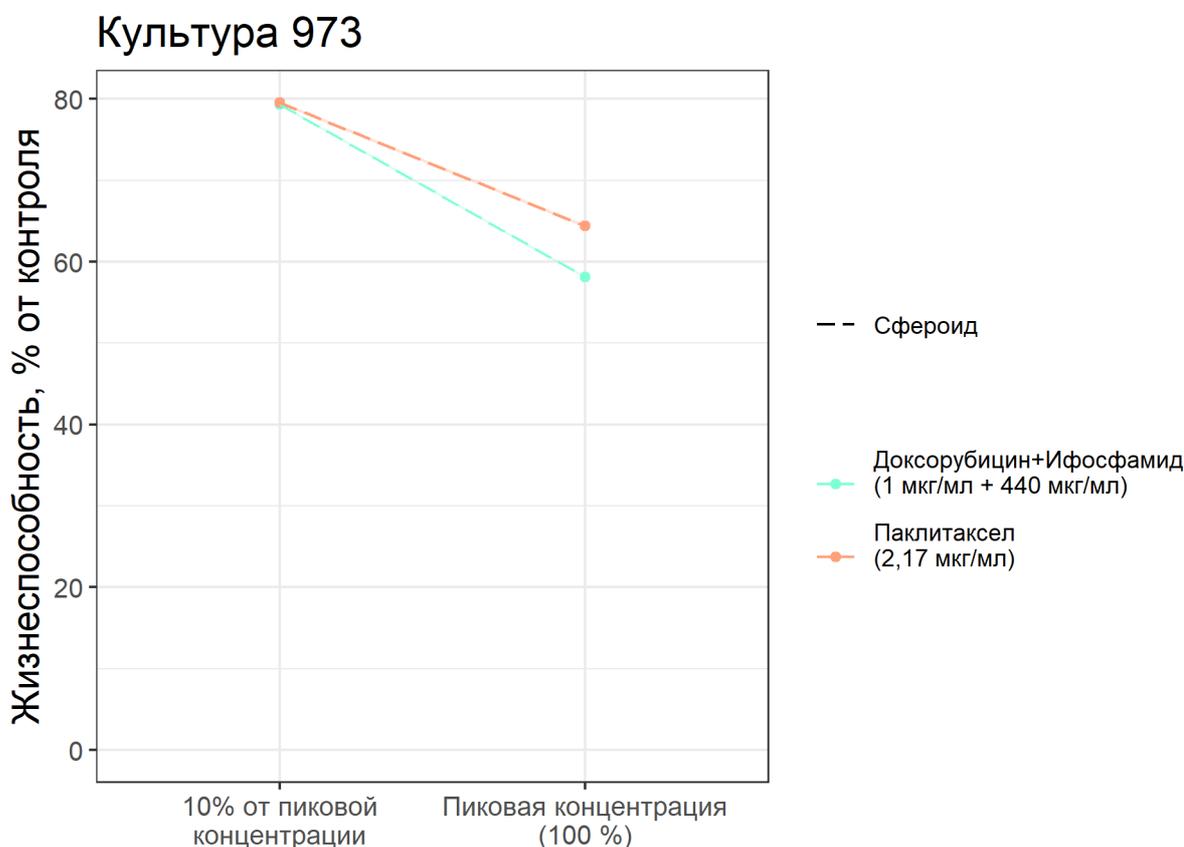


Рисунок 17. Графическое изображение индивидуальных различий в химиочувствительности на препараты паклитаксел и доксорубицин+ифосфамид клетками аденокарциномы молочной железы №973, культивируемых в системах 2D и 3D.

Добавление в культуральную среду опухолюидов пиковой и терапевтической доз приводило к снижению живых клеток на 26,9 и 1,1%, соответственно. Сходное уменьшение жизнеспособных клеток наблюдали и в монослойных культурах: при добавлении пиковой концентрации – на 20,8%, при добавлении терапевтической дозы паклитаксела – на 20,2%.

Проведенный индивидуальный сравнительный анализ эффективности воздействия химиотерапевтических препаратов и их комбинаций *in vitro* и *in vivo* на опухолевые клетки, имеющие различное происхождение и культивируемые в разных модельных системах, в целом демонстрирует, что монослойная культура как тест-система для подбора и индивидуализации лечения больных злокачественными новообразованиями

оправдывает себя в меньшей степени.

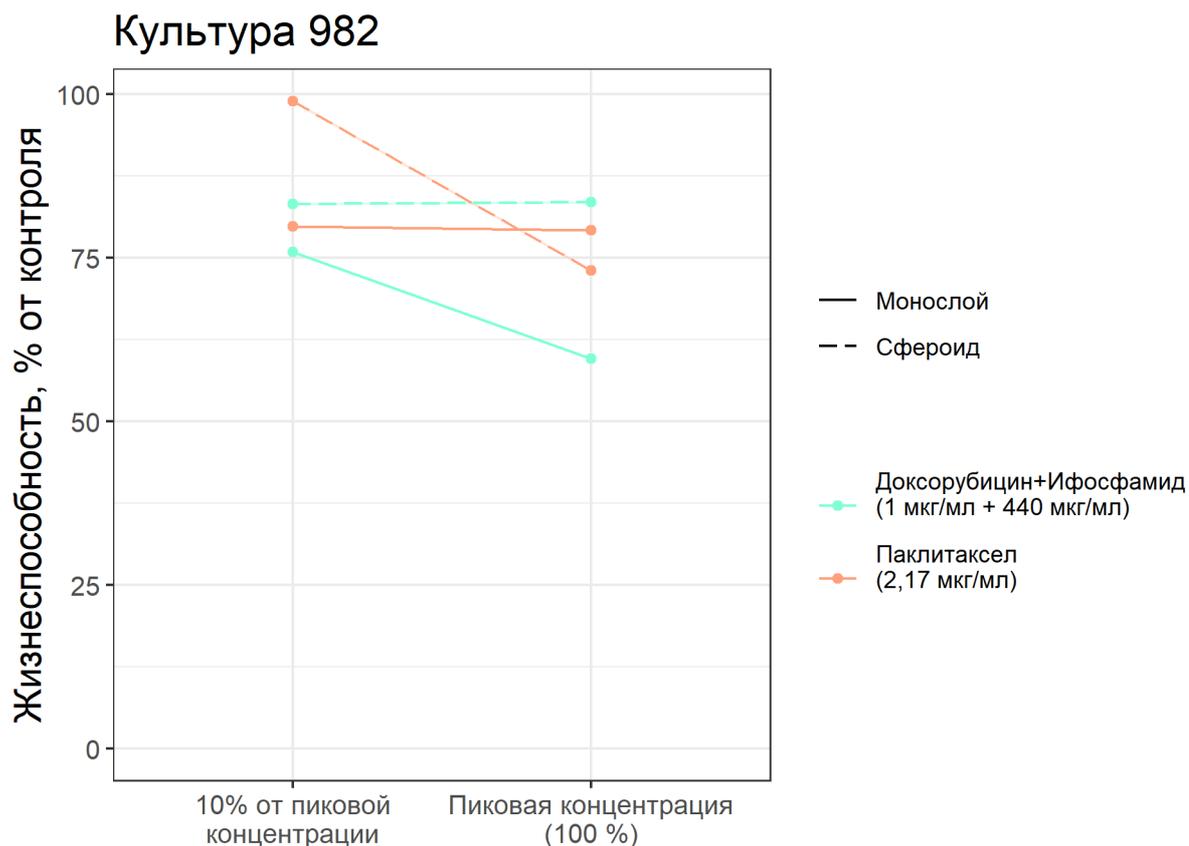


Рисунок 18. Графическое изображение индивидуальных различий в химиочувствительности на препараты паклитаксел и доксорубицин+ифосфамид клетками миксофибросаркомы №982, культивируемых в системах 2D и 3D.

3.9. Исследование инвазивных свойств опухолюидов в матрикеле под влиянием цитостатиков с помощью автоматической аналитической системы Cell-IQ

Для исследования инвазивных свойств опухолюидов в матрикеле в среде с цитостатиками были взяты опухолевые культуры: эмбриональной рабдомиосаркомы № 862, миксофибросаркомы №728 и №982, меланомы кожи №929 и аденокарциномы молочной железы №973 (n=5).

Подбор различных химиотерапевтических агентов и их комбинации бы осуществлен также, как описано в предыдущем разделе (табл.1).

Инвазивный потенциал опухолевых клеток в 3D-системе оценивали по изменению площади, занимаемой сфероидом. Об эффективности химиотерапевтических препаратов судили в данном случае по их способности блокировать «распространение» клеточной массы, фиксируемое в режиме реального времени на приборе Cell-IQ.

При изучении сфероидов, полученных из клеток миксофибросаркомы №728, в

контрольной группе, культивируемой в матрикеле без добавления химиотерапевтических агентов, наблюдали высокий инвазивный потенциал. Через 48 часов площадь, занимаемая опухолевым сфероидом, увеличилась в 3,9 раз: с $122 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$ до $484 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$ (Рис. 19, 20). Эффект торможения роста сфероида наблюдали при культивировании опухолевых сферодов миксофибросаркомы №728 с паклитакселом. Клетки, культивируемые в 3D-системе, были чувствительны к обеим концентрациям этого препарата, при этом площадь, занимаемая сфероидом в матрикеле, для пиковой концентрации (2,17 мкг/мл) увеличилась только с $95 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$ до $136 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$, а для терапевтической дозы - (0,217 мкг/мл) – с $100 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$ до $159 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$ (Рис. 19, 20).

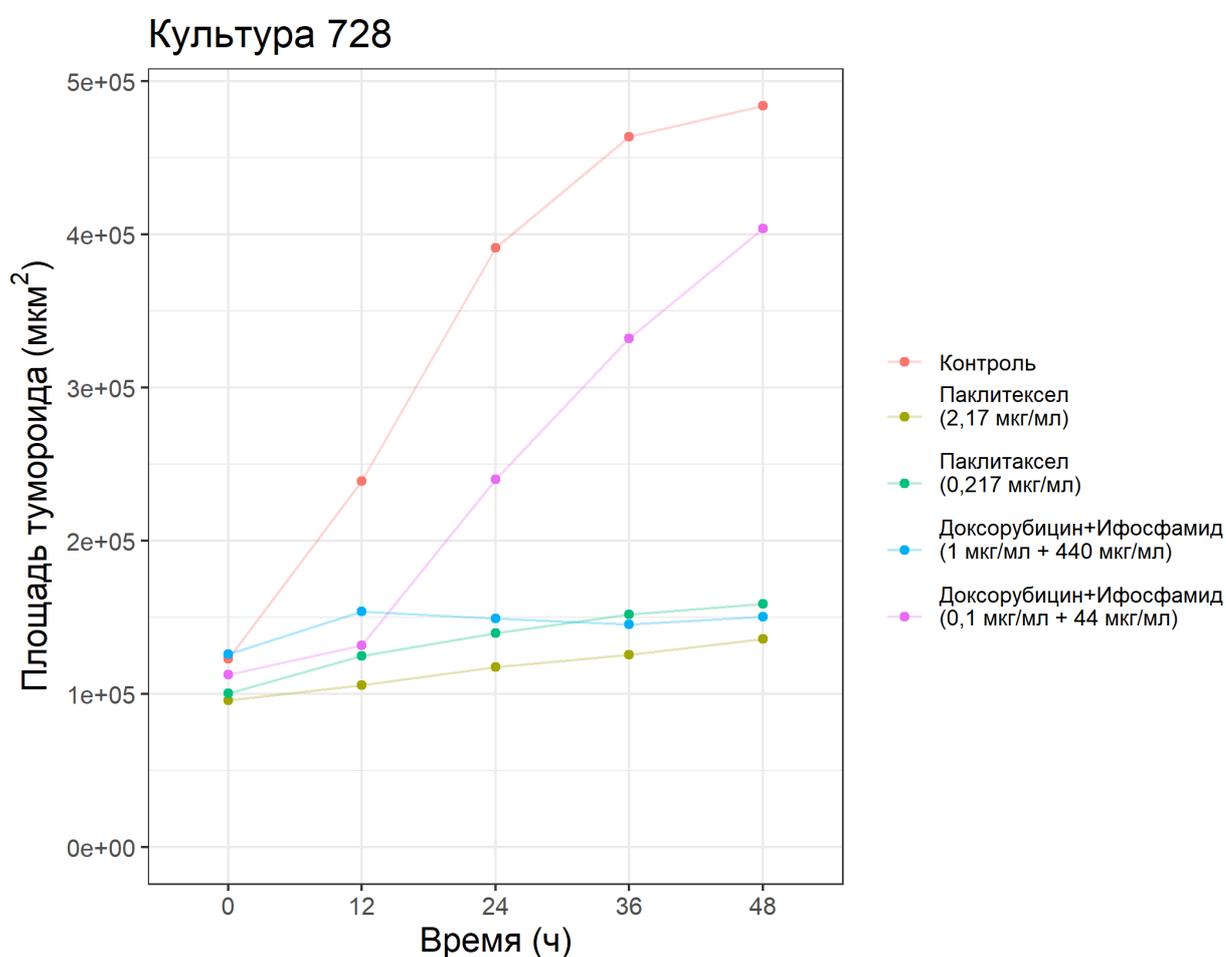


Рисунок 19. Графическое изображение изменения площади опухолевого сфероида миксофибросаркомы №728 (мкм^2) от времени (ч) в зависимости от внесения в культуральную среду химиопрепаратов разной концентрации.

Самый выраженный эффект угнетения инвазивного потенциала наблюдали при добавлении в среду пиковой концентрации доксорубин+ифосфамид (1 мкг/мл + 440 мкг/мл), при этом было отмечено увеличение площади сфероида с $126 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$ до $150 \cdot 10^3 \text{ мкм}^2$.

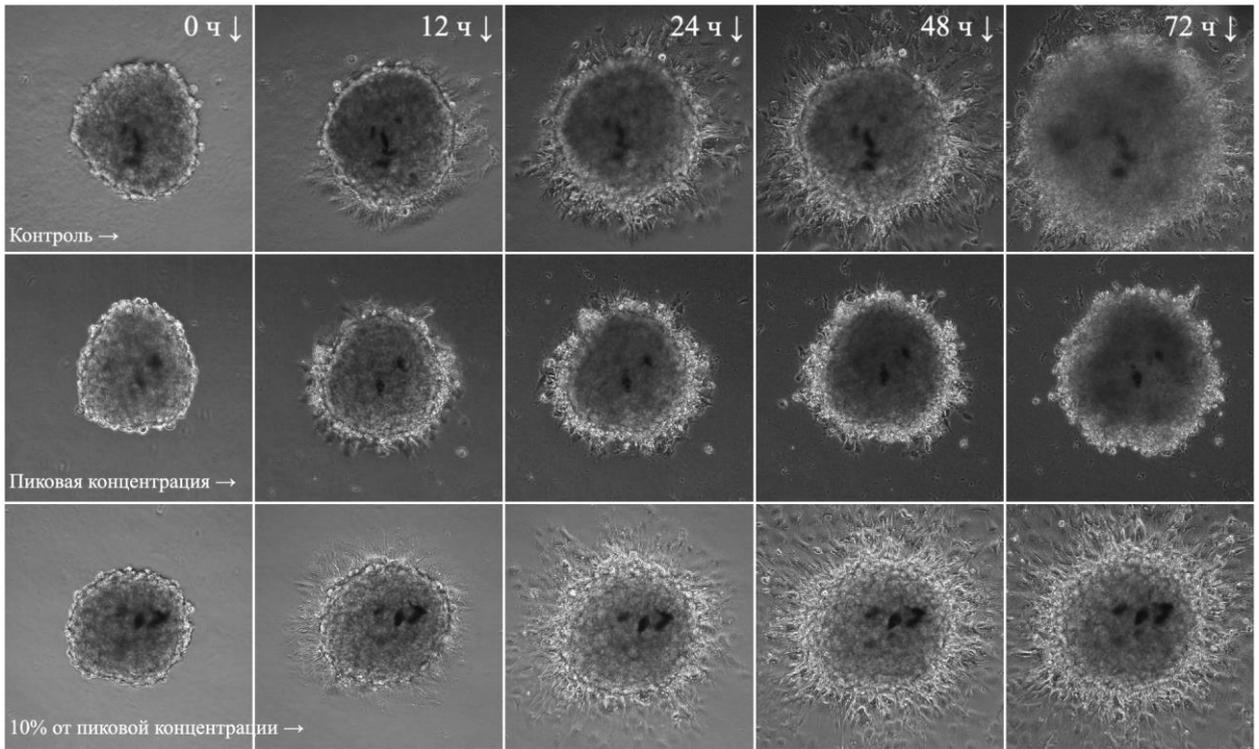


Рисунок 20. Опухолевые сфероиды культуры клеток миксофибросаркомы №728, обработанные доксорубицином+ифосфамидом.

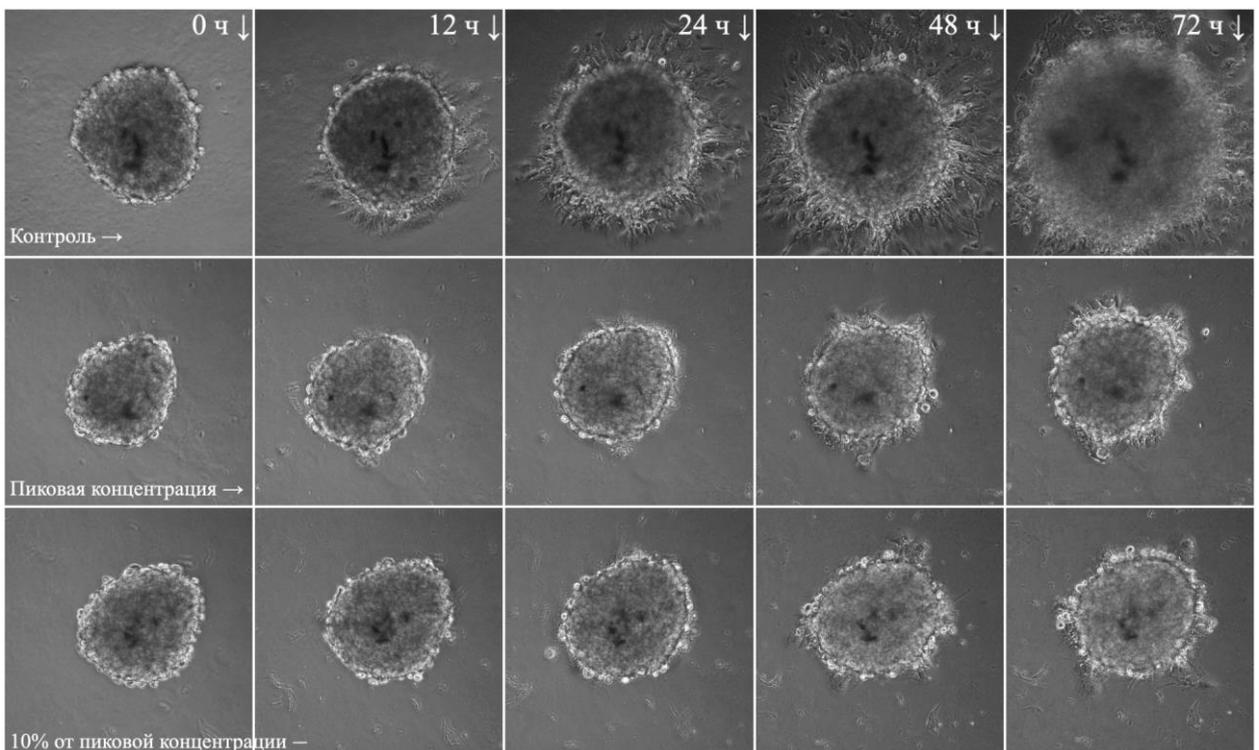


Рисунок 21. Опухолевые сфероиды культуры клеток миксофибросаркомы №728, обработанные паклитакселом.

Однако этот эффект не сохранялся при культивировании опухолей миксофибросаркомы №728 с терапевтической дозой препаратов доксорубин+ифосфамид (0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл). Площадь опухоли увеличивалась с $112 \cdot 10^3$ мкм² до $403 \cdot 10^3$ мкм² (Рис. 19, 21).

Таким образом, под влиянием паклитаксела, и в меньшей степени комбинации препаратов доксорубин+ифосфамид, клетки миксофибросаркомы сохраняли жизнеспособность, но частично теряли инвазивные свойства. Наблюдаемая картина коррелирует с клинической картиной заболевания пациента П.

Результаты изменения инвазивного потенциала с помощью автоматической аналитической системы CellIQ при культивировании с химиопрепаратами в матрикеле совпадают с результатами чувствительности в МТТ-тесте для культуры миксофибросаркомы №728.

При исследовании инвазивных свойств культуры миксофибросаркомы №982 в контрольной группе, культивируемой в матрикеле, наблюдали также высокий инвазивный потенциал: через 48 часов площадь, занимаемая опухолевым сфероидом, увеличилась в 7,2 раза: с $74 \cdot 10^3$ мкм² до $513 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 22, 23).

Максимальный эффект угнетения инвазивного потенциала наблюдали при добавлении в среду пиковой концентрации паклитаксела (2,17 мкг/мл), при этом было отмечено увеличение площади сфероида с $42 \cdot 10^3$ мкм² до $76 \cdot 10^3$ мкм². Эффект угнетения инвазивного потенциала сохранялся при культивировании опухолей миксофибросаркомы №982 с терапевтической дозой препаратов паклитаксела (0,217 мкг/мл). Площадь опухоли увеличивалась с $70 \cdot 10^3$ мкм² до $226 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 22, 23).

Эффект угнетения инвазивных свойств наблюдали и при добавлении комбинации доксорубин+ифосфамид, которую использовали в клинике: при добавлении в среду пиковой концентрации доксорубин+ифосфамид (1 мкг/мл + 440 мкг/мл) было отмечено увеличение площади сфероида с $41 \cdot 10^3$ мкм² до $214 \cdot 10^3$ мкм². Эффект сохранялся при культивировании опухолей миксофибросаркомы №982 с терапевтической дозой препаратов доксорубин+ифосфамид (0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл). Площадь опухоли увеличивалась с $46 \cdot 10^3$ мкм² до $284 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 22, 24).

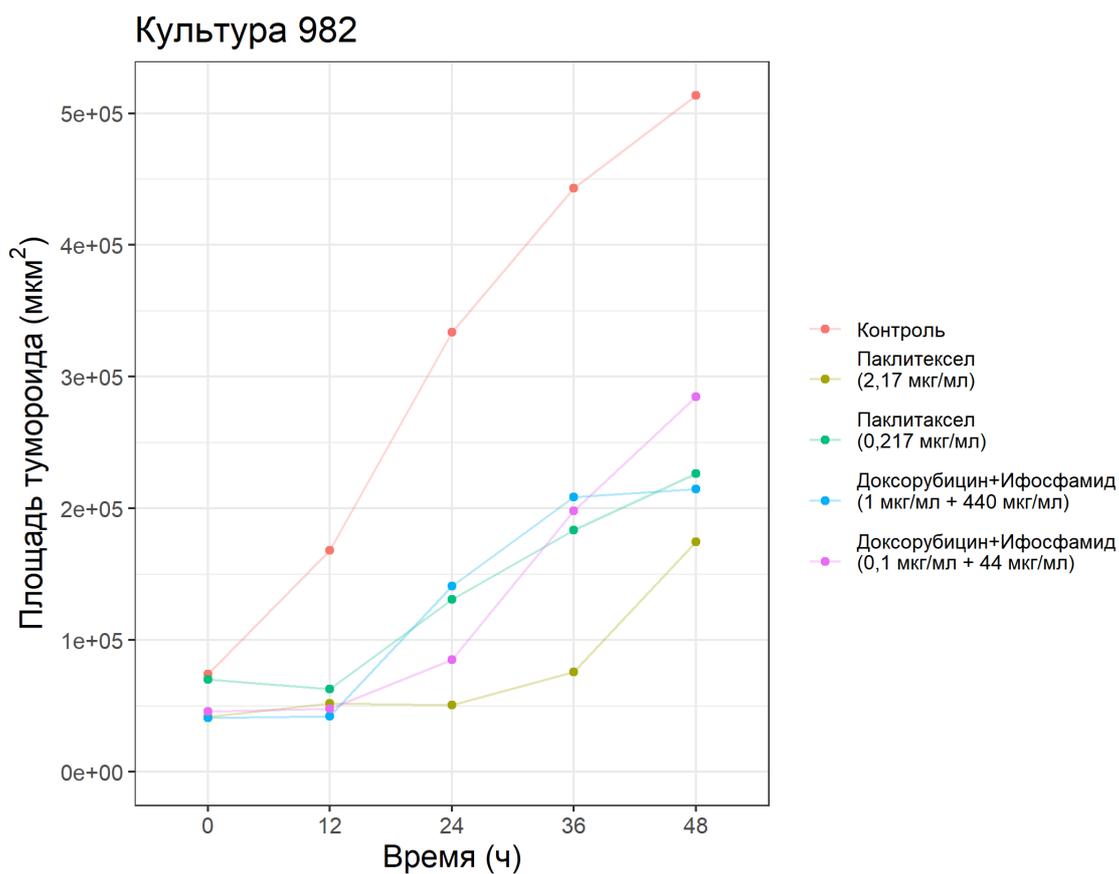


Рисунок 22. Графическое изображение изменения площади опухоида миксофибросаркомы №982 (мкм²) от времени (ч) в зависимости от внесения в культуральную среду химиопрепаратов разной концентрации.

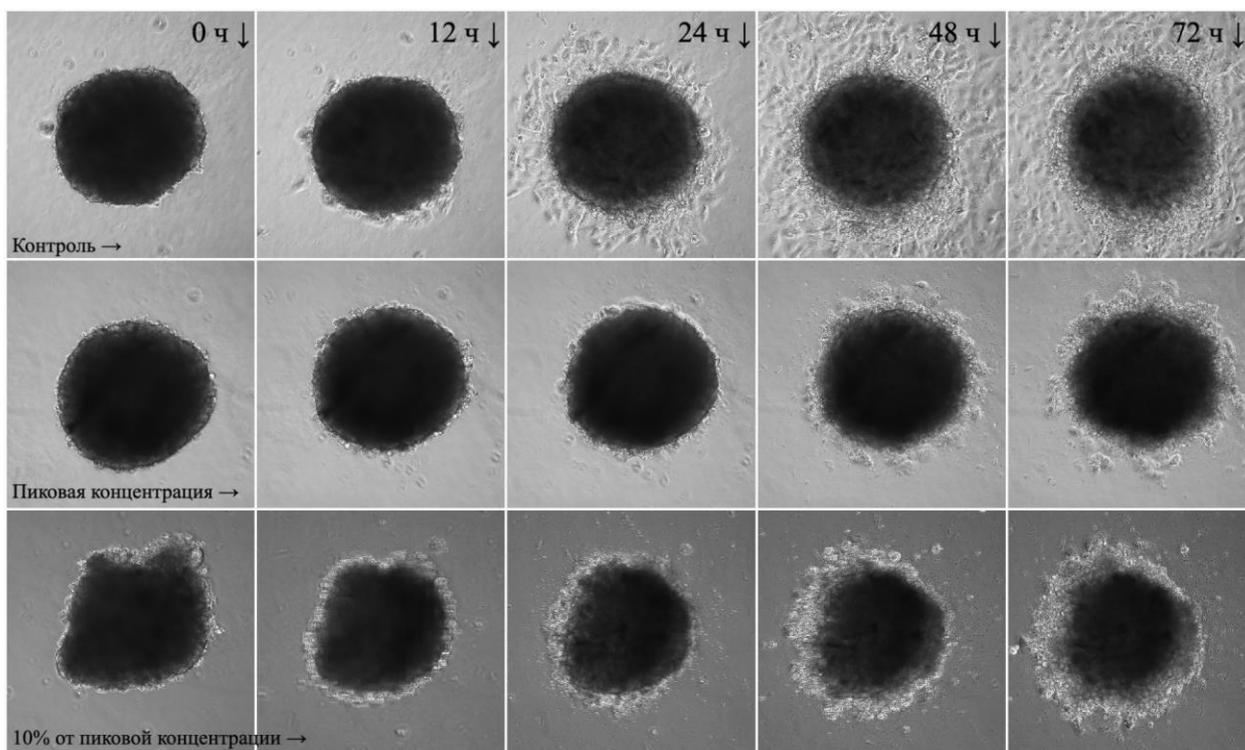


Рисунок 23. Опухолевые сфероиды культуры клеток миксофибросаркомы №982, обработанные паклитакселом.

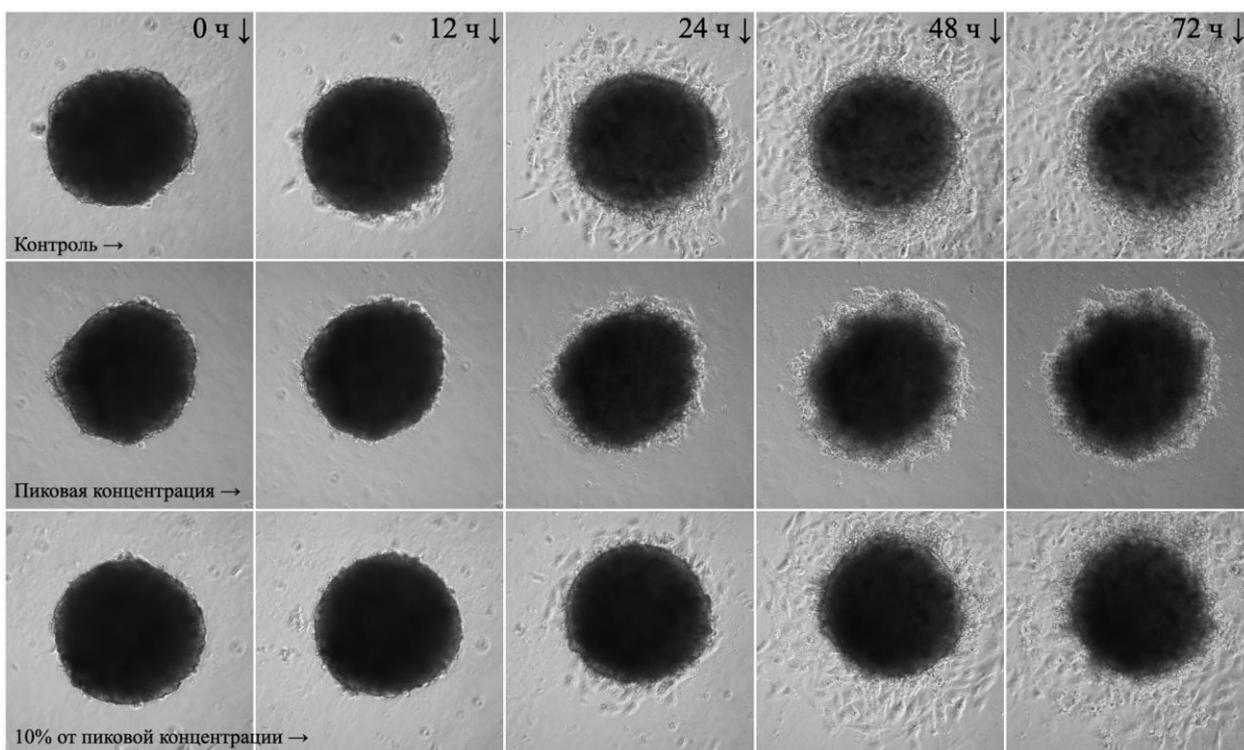


Рисунок 24. Опухолевые сфероиды культуры клеток миксофибросаркомы № 982, обработанные доксорубицином+ифосфамидом.

В клинике лечение миксофибросаркомы пациента А. производили комбинациями: доксорубицин+ифосфамид; гемцитабин+доцетаксел. На фоне линий химиотерапий наблюдали прогрессирование опухолевого заболевания. В тоже время в системе *in vitro* опухолюиды миксофибросаркомы №982 под влиянием паклитаксела демонстрировали снижение инвазивного потенциала. Химиочувствительность к паклитакселу была также продемонстрирована в МТТ-тесте.

Для культуры клеток аденокарциномы молочной железы №973 ретроспективно были выбраны препараты паклитаксел и комбинация доксорубицин+ифосфамид. В клинической практике препараты не продемонстрировали свою эффективность, на фоне лечения наблюдали прогрессирование заболевания. В контрольной группе, культивируемой в матригеле, наблюдали высокий инвазивный потенциал. Через 48 часов площадь, занимаемая опухолевым сфероидом, увеличилась в 4,7 раза: с $100 \cdot 10^3$ мкм² до $467 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 25, 27). Максимальный эффект угнетения инвазивного потенциала наблюдали при добавлении в среду пиковой концентрации доксорубицин+ифосфамид (1 мкг/мл + 440 мкг/мл), при этом было отмечено увеличение площади сфероидов— с $100 \cdot 10^3$ мкм² до $163 \cdot 10^3$ мкм². Эффект сохранялся при культивировании опухолюидов аденокарциномы молочной железы №973 с терапевтической дозой препаратов доксорубицин+ифосфамид (0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл). Площадь опухолюида увеличивалась менее активно, чем в контроле: с $91 \cdot 10^3$ мкм² до $316 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 25, 26).

Культура 973

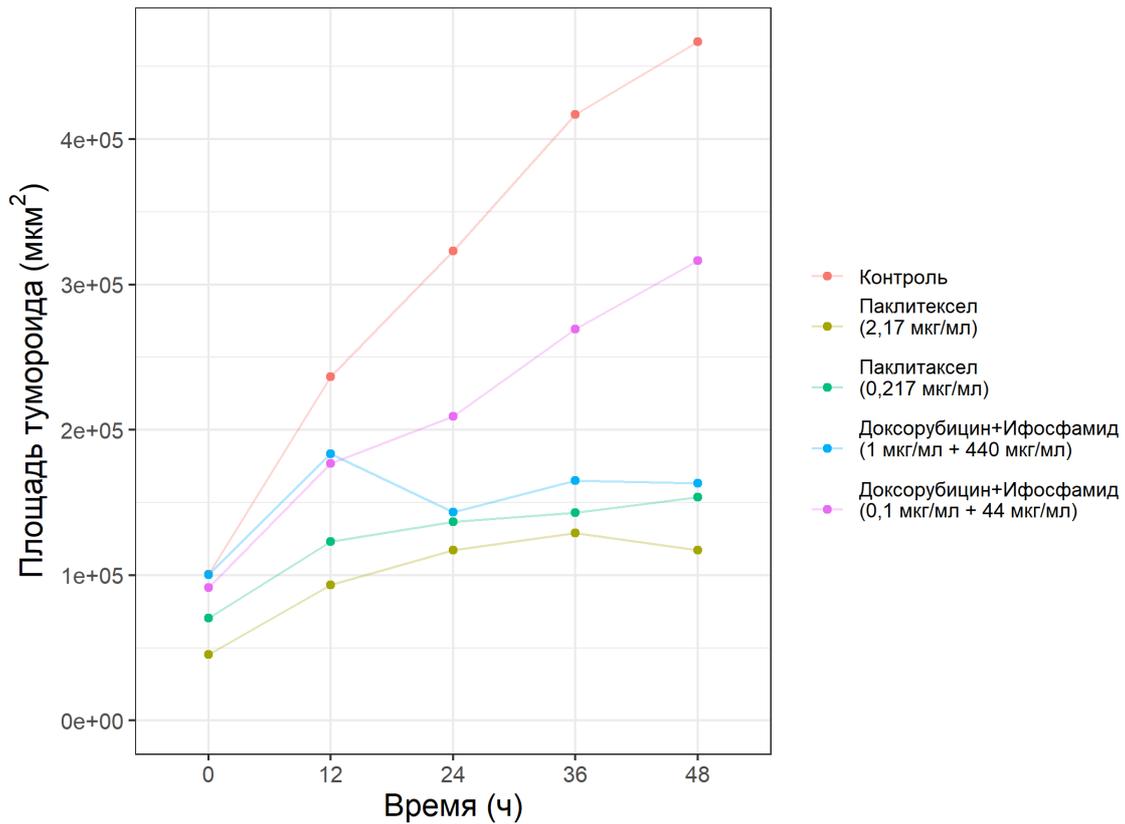


Рисунок 25. Графическое изображение изменения площади опухоида аденокарциномы молочной железы №973 ($\mu\text{м}^2$) от времени (ч) в зависимости от внесения в культуральную среду химиопрепаратов разной концентрации.

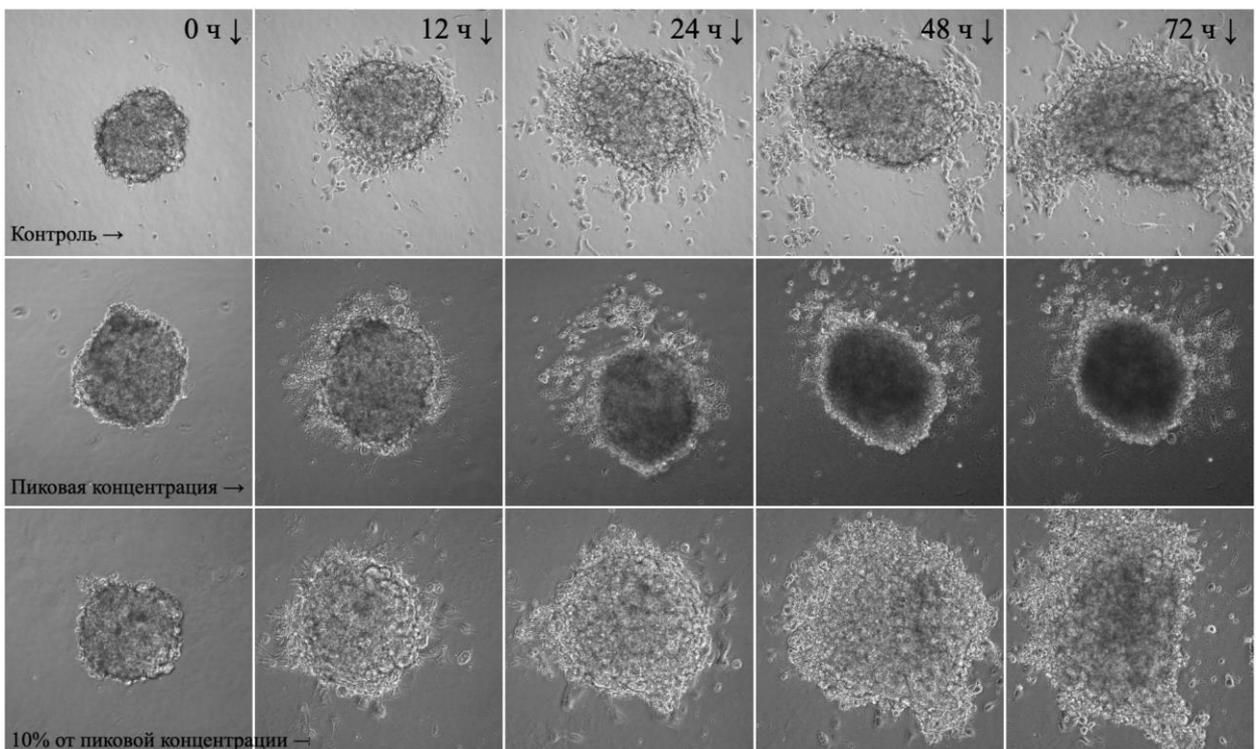


Рисунок 26. Опухолевые сфероиды культуры аденокарциномы молочной железы №973, обработанные доксорубицином+ифосфамидом.

Эффект ингибирования инвазивных свойств опухолюидов наблюдали при культивировании в среде с пиковой концентрацией паклитаксела (2,17 мкг/мл), при этом было отмечено увеличение площади сфероидов с $45 \cdot 10^3$ мкм² до $117 \cdot 10^3$ мкм². Подобный эффект наблюдали и при добавлении в среду терапевтической дозы химиопрепарата (0,217 мкг/мл). Площадь опухолюида увеличивалась с $70 \cdot 10^3$ мкм² до $153 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 25, 27).

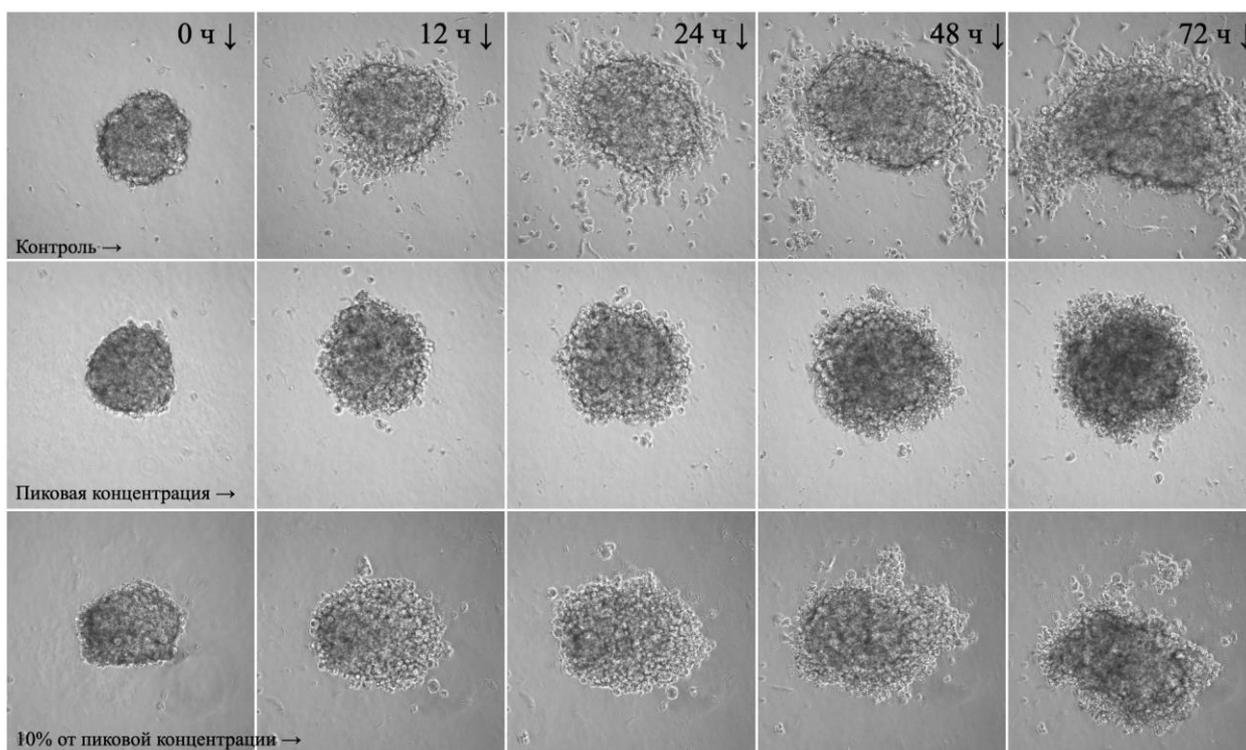


Рисунок 27. Опухолевые сфероиды культуры клеток аденокарциномы молочной железы № 973, обработанные паклитакселом.

Результаты изменения инвазивного потенциала с помощью автоматической аналитической системы CellIQ при культивировании с химиопрепаратами на матрикеле совпадают с результатами чувствительности в МТТ-тесте для культуры аденокарциномы молочной железы №973. Клетки в опухолюидах реагируют на присутствие в среде химиотерапевтических агентов, изменяя свои инвазивные свойства и пролиферативную активность.

При исследовании культуры эмбриональной рабдомиосаркомы №862 опухолюиды контрольной группы проявляли максимальный инвазивный потенциал: занимаемая площадь опухолюида за 48 ч наблюдения увеличивалась почти в 8 раз: с $44 \cdot 10^3$ мкм² до $351 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 28, 29).

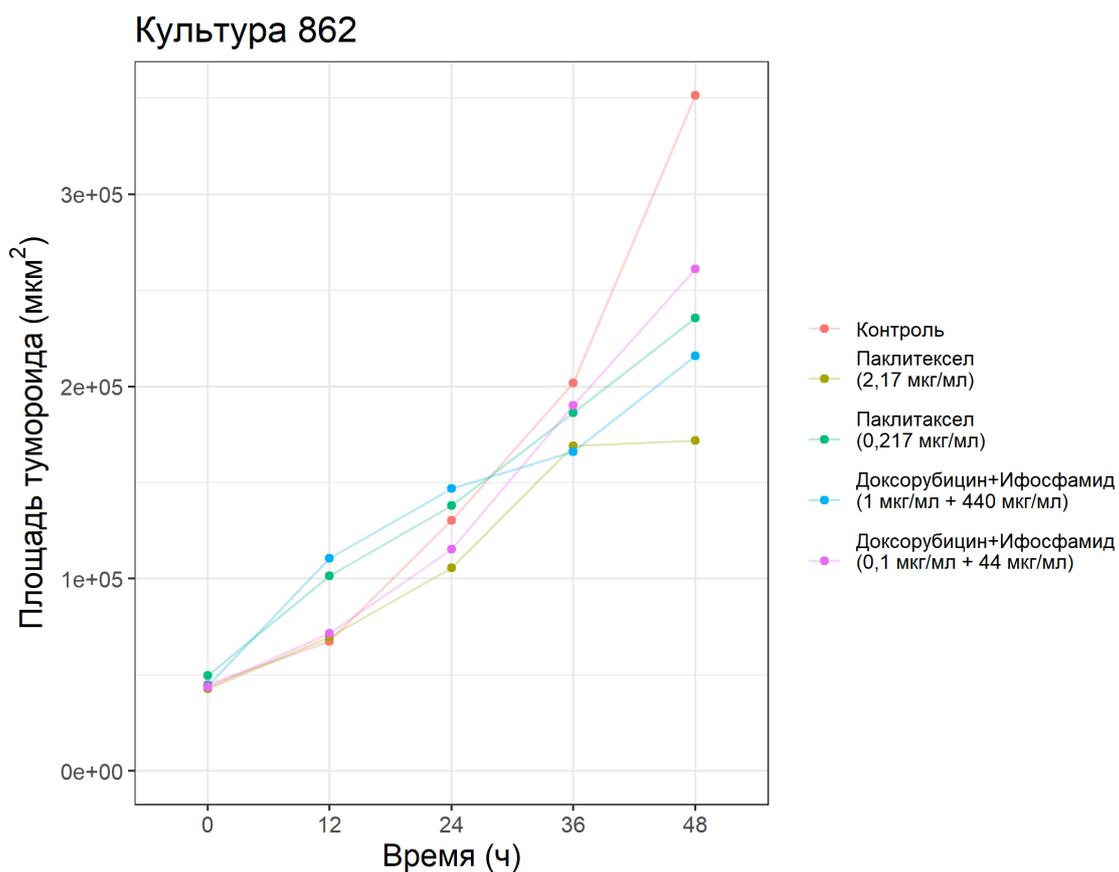


Рисунок 28. Графическое изображение изменения площади опухоороида эмбриональной рабдомиосаркомы (862) (μm^2) от времени (ч) в зависимости от внесения в культуральную среду химиопрепаратов разной концентрации.

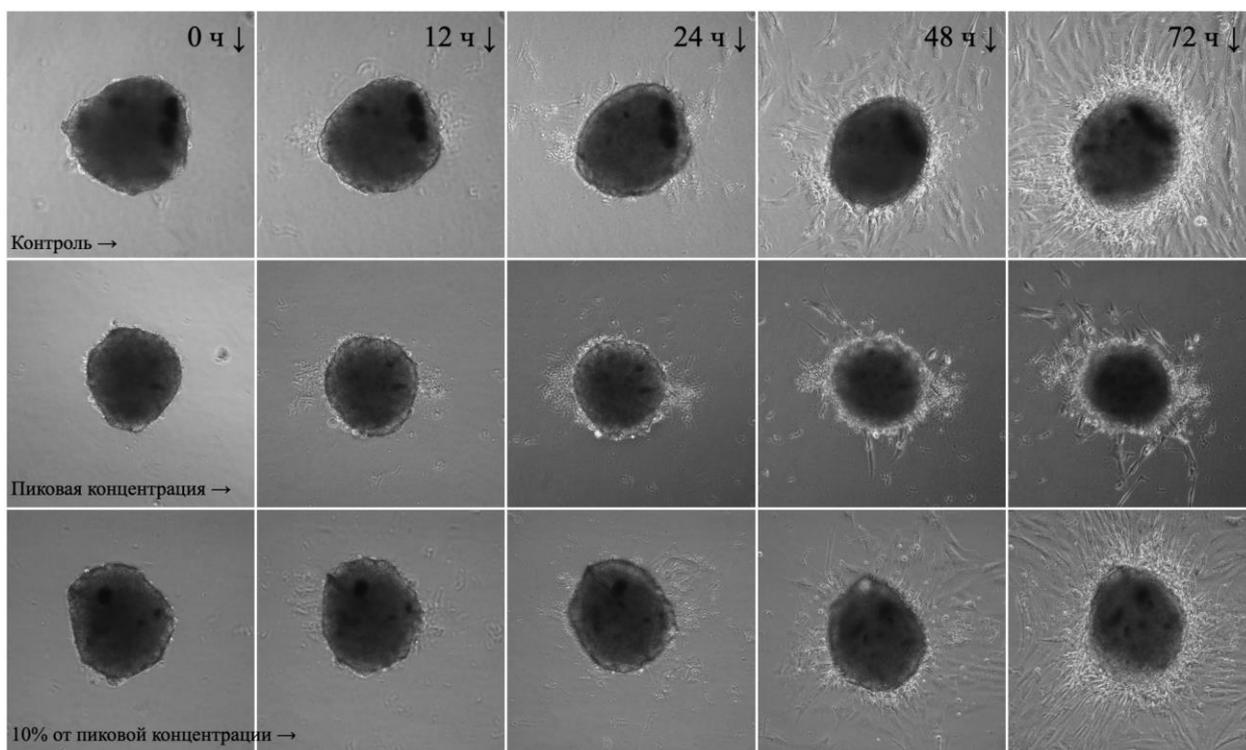


Рисунок 29. Опухолевые сфероиды культуры клеток эмбриональной рабдомиосаркомы № 862, обработанные доксорубицином+ифосфамидом.

Тумороиды этой культуры были имели низкий инвазивный потенциал при добавлении в среду пиковых концентраций паклитаксела и комбинации доксорубицин+ифосфамид. При культивировании с паклитакселом (2,17 мкг/мл) инвазивная площадь сфероидов увеличивалась с $42 \cdot 10^3$ мкм² до $172 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 28, 30), при культивировании с комбинацией доксорубицин+ифосфамид (1 мкг/мл + 440 мкг/мл) – с $44 \cdot 10^3$ мкм² до $216 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 28, 29).

Эффект угнетения инвазивного потенциала незначительно снижался при добавлении терапевтических доз химиопрепаратов: при культивировании с паклитакселом (0, 217 мкг/мл) инвазивная площадь сфероидов увеличивалась с $49 \cdot 10^3$ мкм² до $235 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 28, 30), при культивировании с комбинацией доксорубицин+ифосфамид (0,1 мкг/мл + 44 мкг/мл) – с $43 \cdot 10^3$ мкм² до $261 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 28, 29).

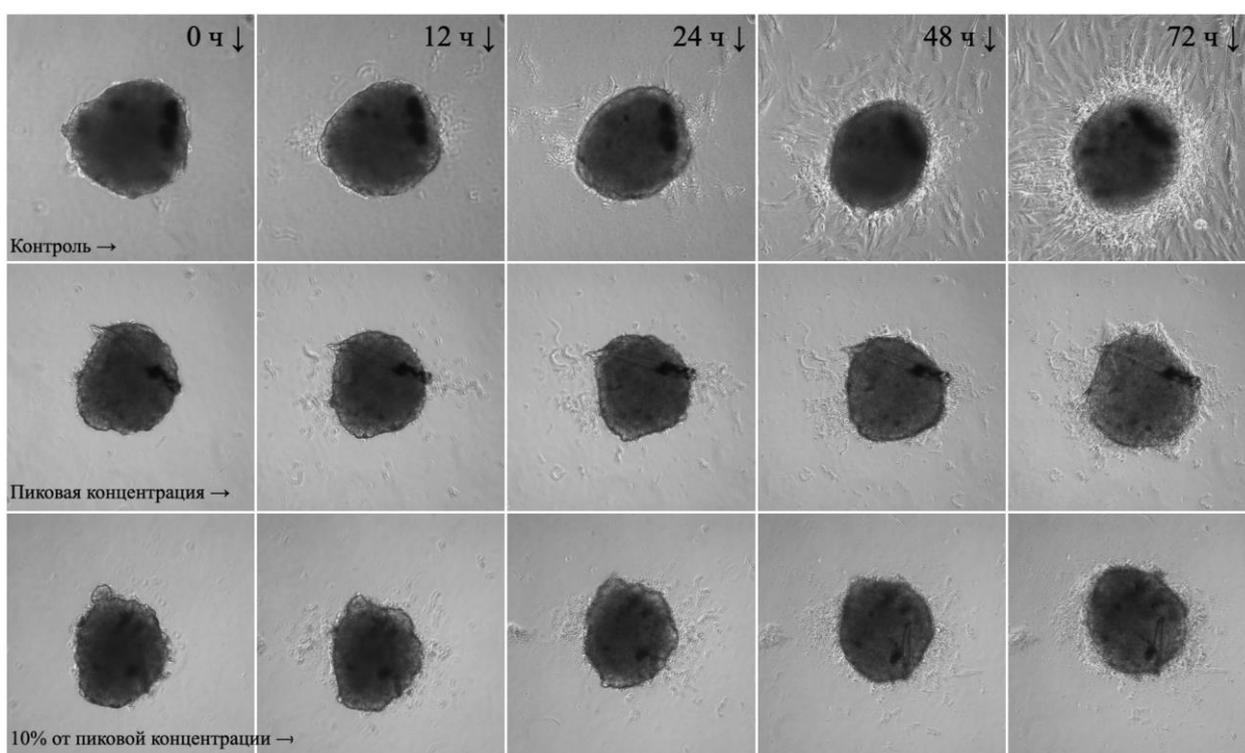


Рисунок 30. Опухолевые сфероиды культуры клеток эмбриональной рабдомиосаркомы № 862, обработанные паклитакселом.

Результаты анализа динамики инвазивного потенциала с помощью автоматической аналитической системы CellIQ при культивировании с химиопрепаратами в матрикеле совпадают с результатами чувствительности в МТТ-тесте для культуры рабдомиосаркомы №862. Тумороиды реагируют на присутствие в среде химиотерапевтических агентов, изменяя свои инвазивные свойства и пролиферативную активность, что соотносится с клиническими результатами лечения пациента К, когда на фоне линий химиотерапии с

включением в схему лечения препарата паклитаксел наблюдали частичный регресс опухолевого очага.

В рамках предпринятых исследований культура меланомы кожи №929 была использована как пример опухоли с высокой резистентностью к химиотерапии, так как все попытки лечения пациента С. не имели успеха. Ко всем подобранным комбинациям химиопрепаратов наблюдали отсутствие ответа клеток внутри опухоля (рис. 31).

Тумороиды контрольной группы проявляли максимальный инвазивный потенциал: занимаемая площадь опухоля увеличивалась почти в 9,5 раз: с $76 \cdot 10^3$ мкм² до $719,5 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 31, 32).

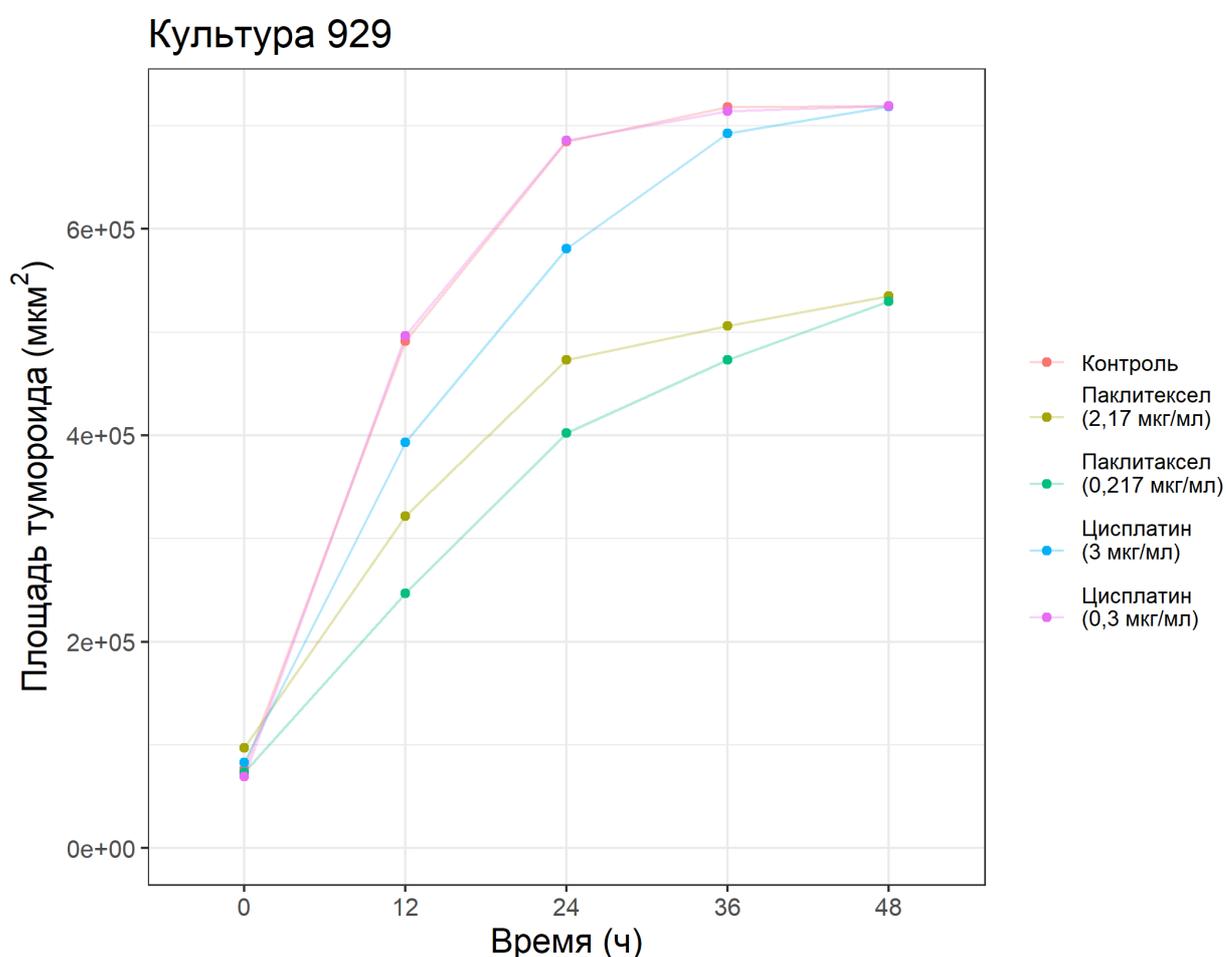


Рисунок 31. Графическое изображение изменения площади опухоля меланомы кожи №929 (мкм²) от времени (ч) в зависимости от внесения в культуральную среду химиопрепаратов разной концентрации.

Незначительный эффект ингибирования инвазивных свойств опухоля наблюдали при культивировании в среде с пиковой концентрацией паклитаксела (2,17 мкг/мл), при этом было отмечено увеличение площади сфероидов в 5,5 раз – с $97 \cdot 10^3$ мкм² до $534 \cdot 10^3$ мкм². Подобный эффект наблюдали и при добавлении в среду терапевтической

дозы химиопрепарата (0,217 мкг/мл). Площадь опухоида увеличивалась в 7,2 раза: с $73 \cdot 10^3$ мкм² до $529 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 31, 32).

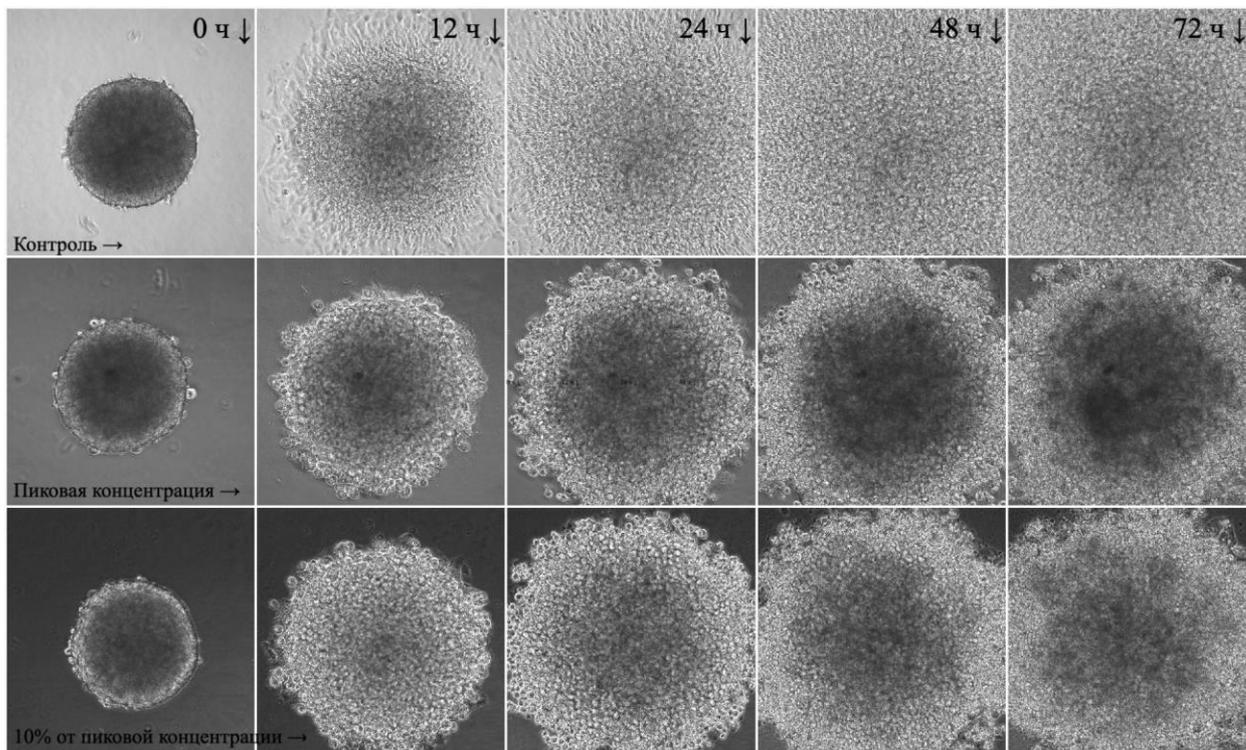


Рисунок 32. Опухолевые сфероиды культуры клеток меланомы кожи № 929, обработанные паклитакселом.

Отсутствие эффекта угнетения инвазивных свойств отмечали при культивировании в среде с цисплатином: при добавлении пиковой концентрации (3 мкг/мл) наблюдали увеличение площади, занимаемой сфероидом в 8,6 раз: с $82 \cdot 10^3$ мкм² до $718 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 31, 33); а при добавлении терапевтической дозы (0,3 мкг/мл) – в 10,4 раза: с $69 \cdot 10^3$ мкм² до $719 \cdot 10^3$ мкм² (рис. 31, 33).

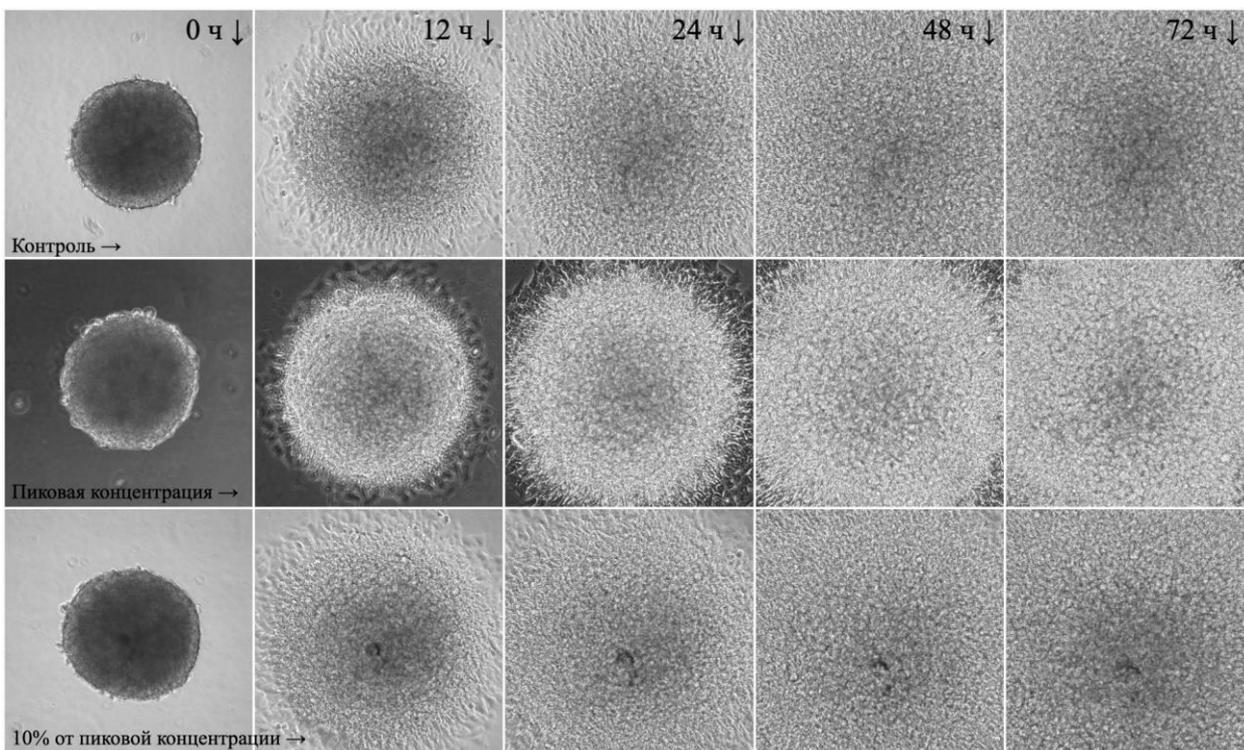


Рисунок 33. Опухолевые сфероиды культуры клеток меланомы кожи № 929, обработанные цисплатином.

В клинике пациент С. получил комплексное лечение на основе препаратов: BRAF- и MEK-ингибиторы, ниволумаб; комбинация паклитаксел+карбоплатин. На фоне лечения наблюдали быстрое прогрессирование заболевания, что и было продемонстрировано с помощью модели опухоидов *in vitro*, которые были не чувствительны к обработке паклитакселом и комбинацией доксорубицин+ифосфамид.

Результаты изменения инвазивного потенциала с помощью автоматической аналитической системы CellIQ при культивировании с химиопрепаратами на матрикеле совпадают с результатами чувствительности в МТТ-тесте для культуры меланомы кожи №929. Тумороиды не реагируют на присутствие в среде химиотерапевтических агентов, не изменяя свои инвазивные свойства и пролиферативную активность.

Таким образом, результаты ретроспективной оценки эффективности воздействия химиопрепаратов и их комбинаций в трехмерной системе *in vitro* демонстрируют перспективность разрабатываемых моделей для выбора тактики и прогнозирования успеха лечения.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время трёхмерные модельные системы актуальны для решения многих теоретических и практических вопросов современной онкологии (Feder-Mengus et al., 2008; Lovitt et al., 2014; Mittler et al., 2017). Одним из направлений является исследование свойств опухолевых клеток, выделенных из злокачественных новообразований пациентов, в трёхмерных биологических системах с целью воссоздания молекулярной сложности канцерогенных механизмов и поиска путей повышения чувствительности к фармакологическому лечению (Heredia-Soto V et al., 2019). По мнению некоторых исследователей, генерация сфероидов особенно важна для изучения сарком, поскольку скорость роста, морфология клеток и межклеточные взаимодействия в сфероиде достаточно хорошо имитируют первичные опухоли (Colella G. et al, 2018).

В данной работе мы создавали опухолевые сфероиды (тумороиды) из культур клеток, выделенных из солидных опухолей разного гистотипического происхождения, полученных интраоперационно в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России. Необходимо отметить, что почти все образцы имели метастатическое происхождение. 9 из 10 полученных опухолевых клеточных культур были способны к спонтанной агрегации и формировали сфероиды в заданных условиях. Все полученные сфероиды имели индивидуальные особенности, которые были характерны для исходных тканей.

Мы оптимизировали протоколы формирования тумороидов с целью быстрого получения большого количества сфероидов за короткий промежуток времени. Для этого мы сравнили две методики Hanging drop method и Liquid overlay technique.

Предпочтения среди исследователей по применению различных технологий в создании опухолевых сфероидов разнообразны (Katt et al., 2016). Мы пришли к выводу, что Hanging drop method и Liquid overlay technique приемлемы для цели и задач нашего исследования, поскольку позволяют получать тумороиды с нужным размером. Технология Liquid overlay technique продемонстрировала простоту в получении сфероидов, в смене среды в лунках планшета и в проведении манипуляций по фиксации и окраске. Она позволила получать большое количество сфероидов в кратчайшие сроки. Клетки в планшете подвергаются наименьшему стрессу по сравнению с Hanging drop method, что не влияло на эксперимент. Эти же преимущества отмечают исследователи, которые работают с данной технологией (Costa et al., 2018).

Мы провели сравнительное исследование с помощью методов иммуногисто-/цитохимии пролиферативной активности, метаболической активности опухолевых клеток

исходного злокачественного новообразования, монослойной культуры опухолевых клеток и опухолей путем выявления маркера пролиферации Ki-67, маркера метаболической активности GLUT-1, а также маркера клеточной адгезии и эпителиально-мезенхимального перехода E-cadherin. Мы обнаружили сходство между сфероидом и опухолевой тканью в наличии градиента питательных веществ и продуктов метаболизма, что находит отражение в градиентном распределении Ki-67 и GLUT-1.

Распределение Ki-67 в наших трехмерных моделях было двух разновидностей: периферийное в случае, когда пролиферирующие клетки концентрировались в краевой зоне сфероида, и диффузное по всей толщине опухоли. Причем увеличение размера сфероида приводило к преобладанию преимущественно периферийной локализации Ki-67-позитивных клеток. В работе A. Voissiere и соавт. (2017) по исследованию многоклеточных сфероида хондросаркомы человека было отмечено, что распределение Ki-67 у сфероида на 7-й день культивирования было однородное, тогда как у более крупных сфероида (14-й и 20-й день культивирования) Ki-67 был в основном локализован на периферии (Voissiere et al., 2017).

Однородное распределение GLUT-1 было продемонстрировано в работе M. Vinci и соавт. (Vinci et al., 2012). В нашем исследовании мы отметили два типа окрашивания: однородное и окрашивание от центра к периферии.

Наличие однородного и локализованного окрашивания мы связали с наличием явного градиента веществ с увеличением размера опухолей: чем больше размер, тем больше преобладает зональный тип окрашивания (Hirschhaeuser et al., 2010).

Явную экспрессию маркера клеточной адгезии E-cadherin наблюдали только в опухолях, сформированных из опухолевых клеток эпителиального происхождения (культура клеток аденокарциномы молочной железы №973). Распределение молекул E-cadherin было однородным в опухолях, как и в самой опухоли. В исследовании A. Amann и соавт. (2014) была изучена экспрессия E-cadherin в сфероидом клеточной линии рака легкого A549. Авторы продемонстрировали, что потеря этих рецепторов клеточной адгезии ведёт к преобладанию мезенхимального фенотипа и инвазивной активности опухолевых клеток (Amann et al., 2014). В нашем исследовании мы наблюдали низкий инвазивный потенциал клеток аденокарциномы молочной железы в матрикеле при высокой экспрессии E-cadherin по сравнению с другими клетками солидных опухолей (сарком и меланомы кожи). Наши результаты свидетельствуют о том, что в культуральных условиях сфероиды сохраняют характеристики опухолевого очага и могут быть использованы как адекватная модель для воспроизведения реальной клинической ситуации.

С помощью конфокальной микроскопии мы создали трёхмерные изображения опухолевых сфероидов, в которых наблюдали структурные особенности клеток, культивируемых в трёхмерной системе. Данная методика позволила увидеть неоднородность архитектуры опухолевого сфероида: на периферии находились круглые пролиферирующие клетки, тогда как в центре – вытянутые покоящиеся клетки, сложно ориентированные относительно друг друга в пространстве.

Мы оценили продукцию альдегиддегидрогеназы в опухоороидах и в монослойных культурах. Альдегиддегидрогеназа (ALDH, от англ. aldehyde dehydrogenase) – НАДФ-зависимый фермент, основная роль которого – защита клеток от оксидативного стресса путем окисления эндогенных и экзогенных альдегидов до соответствующих карбоксильных кислот. ALDH считается метаболическим маркером стволовых клеток различных опухолей, характеризующихся экспрессией генов стволовых клеток (Sox2, Nanog, Oct4 и др.), высокой клоногенностью *in vitro*, опухоленностью *in vivo*, а также резистентностью к химиотерапевтическим препаратам.

В трехмерной культуре формируется выраженное гипоксическое ядро, в котором содержание стволовых клеток, экспрессирующих ALDH, значимо превышает долю этих клеток на периферии (Reynolds et al., 2017). Такое распределение можно объяснить снижением доступа кислорода и питательных веществ в более глубокие слои сфероида, что способствует формированию фенотипа стволовых клеток (He et al., 2018). Поэтому можно предположить, что содержание стволовых клеток опухоли будет выше в опухолевых сфероидов, чем в монослое. В нашем исследовании не было получено существенных различий по продукции ALDH культурами опухолевых клеток в зависимости от формата культивирования. Возможно, для формирования пула ALDH-позитивных опухолевых клеток внутри опухоороида необходимо создание опухолевого микроокружения путём кокультивирования опухолевых клеток со стромальными элементами и клетками иммунной системы.

Как известно, опухолевые клетки обладают пластичностью, позволяющей им моделировать опухолевое микроокружения, делая его благоприятным для их пролиферации и диссеминации (Wu T et al., 2017). Мы сравнили продукцию некоторых факторов, ингибирующих функции клеток иммунной системы и участвующих в процессах инвазии и метастазирования, опухолевыми клетками, культивируемыми в 2D- и 3D-системах. Нам удалось установить, что в 3D-формате опухолевые клетки характеризуются более выраженной секреторной активностью в отношении иммуносупрессивных факторов и факторов, обеспечивающих их подвижность. В частности, интерлейкин-10 (IL-10) способствует привлечению и активации регуляторных Т-лимфоцитов (Treg),

приобретению дендритными клетками толерогенного фенотипа, подавлению активности CD8⁺-Т-лимфоцитов и NK-клеток (Belli et al., 2018). Фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF) связывается с CD74 и CXCR2 на моноцитах и макрофагах, что приводит к интегрин-зависимому хемотаксису моноцитов в опухолевый очаг (Bernhagen et al., 2007).

Передача сигнала по оси CCL2–CCR2 связана с привлечением макрофагов и Treg в опухоль (Quail and Joyce, 2013), что может способствовать опухолевой прогрессии. Хемокин CXCL16 влияет на миграцию NKT и незрелых лимфоидных клеток (Bachelier et al., 2014). Сигнализация через ось CXCL12–CXCR4 способствует выживанию, пролиферации, метастазированию и приобретению лекарственной устойчивости опухолевых клеток (Nam et al., 2018).

Взаимодействие лиганда MICA на опухолевых клетках с рецептором NKG2D на NK-клетках приводит к активации натуральных киллеров с последующей элиминацией опухолевых клеток. Однако для большинства опухолей характерна гиперпродукция этого лиганда с последующим "слушиванием" стресс-индуцированных молекул MICA с поверхности малигнизированных клеток, что приводит после взаимодействия NK-клеток с такой растворимой формой молекулы к потере их эффекторных функций (Carbone et al., 2005).

TGF- β является мультипотентным фактором роста, влияющим на дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и продукцию матрикса нормальными и опухолевыми клетками. TGF- β обладает двойным действием на опухолевые клетки: в качестве супрессора опухоли и промотора опухоли. Как супрессор опухоли, он ингибирует опухолеобразование, индуцируя остановку роста и апоптоз. Как промотор опухоли, он индуцирует миграцию опухолевых клеток и стимулирует эпителиально-мезенхимальному переход (Plou et al., 2018).

Мы продемонстрировали, что клетки в опухолевых сфероиде продуцируют большее количество иммуносупрессирующих факторов таких как MICA, IL10, MIF, в ряде случаев TGF- β 1, а также факторов, привлекающих клетки иммунной системы в строму опухоли (CCL2, CCL3, CXCL16), по сравнению с монослойными культурами. Тем самым мы показали, что для имитации профиля секретируемых факторов опухолевыми необходимо учитывать условия их культивирования, максимально приближая их к естественным.

Недостатком скрининга лекарственных средств с использованием монослойных клеточных моделей является отсутствие в большинстве случаев корреляции между результатами, полученными в экспериментальных условиях, реальными клиническими

результатами лечения. Разработанные нами опухоиды являются патофизиологически значимыми доклиническими моделями для исследования инвазивных фенотипов опухолей.

T. Puls и соавт. (2018) разработали трёхмерные модели рака поджелудочной железы в совокупности с опухольассоциированными фибробластами и исследовали инвазивный потенциал клеток на матригеле при добавлении в среду гемцитабина. Авторам удалось найти эффективную дозу, при которой опухолевый сфероид не распространяется в окружающий его матригель, а также показать, что гемцитабин не индуцирует гибель опухолевых клеток, а лишь изменяет их инвазивные характеристики и тормозит пролиферацию (Puls et al., 2018). Аналогичные результаты мы получили при исследовании химиочувствительности сфероидов другого происхождения (саркомы, меланома кожи, рак молочной железы). С помощью МТТ-теста мы исследовали ретроспективно химиочувствительность опухоидов и монослойных культур на химиопрепараты и их комбинации, которые были использованы в лечении пациентов в клинике. Мы увидели, что в 3D-системе опухолевые клетки проявляют устойчивость к противоопухолевым препаратам, тогда как в монослойных культурах наблюдали цитотоксический эффект. Было отмечено, что в среде с химиопрепаратами сфероиды перестают активно набирать опухолевую массу, но тем не менее клетки не погибают.

Чтобы оценить преимущества доклинического тестирования химиопрепаратов на 3D-системы по сравнению с 2D-системами, мы культивировали опухоиды в матригеле в среде с добавлением химиопрепаратов. Мы установили взаимосвязь между клинической картиной опухолевого заболевания (прогрессирование, стабилизация, регресс) и инвазивным потенциалом опухолевых клеток, таким образом показав, что опухоиды могут служить адекватной моделью, позволяющей оценить эффективность возможного лечения и выбрать тактику ведения больного (Табл. 5).

Таблица 5. Сравнение результатов воздействия на опухолевые клетки в 2D и 3D системах *in vitro* и клинической картины лечения пациентов.

№ культуры	Препарат	Концентрация препарата (10% и пик концентрации в плазме крови больного), мкг/мл	Химиочувствительность (МТТ-тест), % жизнеспособных клеток		Инвазивный потенциал, абсолютное изменение площади сфероиды *10 ³ мкм ²		Лечение пациента и эффект лечения
			Монослойные культуры	Сфероиды	Эксперимент	Контроль	
929	Паклитаксел	0,217	137	108,3	456,5	643	BRAF- и MEK ингибиторы, ниволумаб; паклитаксел+ карбоплатин
		2,17	98,7	98,7	437,6		
	Цисплатин	0,3	92,6	90,6	650		
		3	85,9	89,7	636		
973	Паклитаксел	0,217	–	79,6	83,3	366,6	Доксорубин+Циклофосфамид; Доцетаксел+Карбоплатин; Эрибулин+Капецитабин
		2,17	–	64,4	71,6		
	Доксорубин+Ифосфамид	0,1 + 44	–	79,3	225		
		1 + 440	–	58,1	62,9		
728	Паклитаксел	0,217	90,7	85,6	58,7	361,3	Доксорубин+Циклофосфамид
		2,17	93	92,1	40,4		
	Доксорубин+Ифосфамид	0,1 + 44	34	81,9	291,2		
		1 + 440	27,1	79	24,5		
862	Паклитаксел	0,217	92,4	97,6	185,9	306,7	Винкрестин+Ифосфамид+Этопозид; Винкрестин+Карбоплатин+Эпирубицин; Винкрестин+Топотекан+Циклофосфамид
		2,17	92,3	98,8	129,1		
	Доксорубин+Ифосфамид	0,1 + 44	30,3	84,2	217,5		
		1 + 440	26,1	86,9	171,8		
982	Паклитаксел	0,217	79,1	98,9	156,2	439,6	Доксорубин+Ифосфамид; Гемцитабин+Доцетаксел
		2,17	79,8	73	132,6		
	Доксорубин+Ифосфамид	0,1 + 44	76	83,2	238,6		
		1 + 440	59,6	83,5	173,5		

Красным цвет отмечено отсутствие ответа (прогрессия), зелёным – наличие эффекта (регресс), жёлтым – стабилизация.

Для более точного моделирования опухолевого микроокружения мы планируем провести исследования наших моделей путем создания гетеросфероидов, где опухолевые клетки кокультивируют со стромальными элементами, такими как фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки, клетки иммунной системы, эндотелиоциты и др. Как уже было продемонстрировано в исследованиях T. Puls и соавт., кокультивирование опухолевых клеток с фибробластами меняет инвазивные характеристики клеток внутри сфероида (Puls et al., 2018). На важность изучения гетеросфероидов указывает исследование Shao H. и соавт. (Shao H. et al., 2020).

Тем не менее мы предполагаем, что первичный скрининг химиотерапевтических препаратов на моделях гомосфероидов, созданных из опухолевых клеток конкретных пациентов, может способствовать конкретизации выбираемой тактики лечения. Почти все исследования инвазивных характеристик опухолевых клеток в трёхмерной системе зачастую проводят на постоянных клеточных линиях . (Jensen C. et al., 2020)

Созданные нами тумороиды, воспроизводящие ключевые характеристики опухолевого очага, могут служить доклинической моделью для тестирования противоопухолевых препаратов. В перспективных исследованиях сфероиды (тумороиды) могут быть использованы в качестве индивидуальной предиктивной тест-системы, оценивающей функциональные характеристики клеток опухоли и иммунной системы больных злокачественными новообразованиями.

ВЫВОДЫ

1. Созданы и охарактеризованы индивидуальные трехмерные модели из клеток солидных опухолей пациентов, которые имитируют бессосудистую фазу роста опухолевого очага.

2. Показано, что в 3D-формате опухолевые клетки характеризуются более выраженной секреторной активностью в отношении целого спектра иммуносупрессивных факторов противовоспалительного цитокина IL-10, фактора, ингибирующего миграцию макрофагов, MIF, макрофагального воспалительного белка MIP-1a/CCL3), а также факторов, обеспечивающих миграцию стромальных элементов в опухолевый очаг (фактора хемотаксиса моноцитов MCP-1/CCL2 и, хемокиновый лиганд SCYB16/CXCL16, хемоаттрактант SDF-1/CXCL12).

3. Пролиферативная (Ki-67) и метаболическая (GLUT-1) активность опухолевых клеток внутри опухоляда значительно выше, чем в монослойных культурах, и приближается к характеристикам опухолевой ткани.

4. Все исследованные культуры опухолевых клеток обладали инвазивным потенциалом, определяемым по скорости распространения сфероидов в матрикеле. Воздействие химиопрепаратов приводило к ингибированию процессов увеличения площади сфероидов, при этом феномен торможения инвазии коррелировал с клиническими результатами лечения больных.

5. Установлена взаимосвязь между эффектом воздействия химиопрепаратов на опухоляды и клиническим ответом на лекарственное лечение у пациентов: По сравнению с монослойными культурами трёхмерные модели продемонстрировали адекватный ответ на химиотерапию, что позволяет использовать опухоляды как тест-системы для индивидуализации лечения онкологических больных

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alfarouk, K.O., Verduzco, D., Rauch, C., Muddathir, A.K., Bashir, A.H.H., Elhassan, G.O., Ibrahim, M.E., Orozco, J.D.P., Cardone, R.A., Reshkin, S.J., et al. (2014). Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question. *Oncoscience 1*, 777–802.
2. Baek, N., Seo, O.W., Lee, J., Hulme, J., and An, S.S.A. (2016a). Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. *Drug Des. Devel. Ther. 10*, 2155–2165.
3. Baek, N.H., Seo, O.W., Kim, M.S., Hulme, J., and An, S.S.A. (2016b). Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time. *Onco. Targets. Ther. 9*, 7207–7218.
4. Bai, C., Yang, M., Fan, Z., Li, S., Gao, T., and Fang, Z. (2015). Associations of chemo- and radio-resistant phenotypes with the gap junction, adhesion and extracellular matrix in a three-dimensional culture model of soft sarcoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res. 34*, 1–10.
5. Bartling, B., Hofmann, H.S., Silber, R.E., and Simm, A. (2008). Differential impact of fibroblasts on the efficient cell death of lung cancer cells induced by paclitaxel and cisplatin. *Cancer Biol. Ther. 7*, 1250–1261.
6. Benien, P., and Swami, A. (2014). 3D tumor models: History, advances and future perspectives. *Futur. Oncol. 10*, 1311–1327.
7. Benton, G., George, J., Kleinman, H.K., and Arnaoutova, I.P. (2009). Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix. *J. Cell. Physiol. 221*, 18–25.
8. Benton, G., Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., and Koblinski, J. (2014). Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv. Drug Deliv. Rev. 79*, 3–18.
9. Bjerkvig, R., Tonnesen, A., Laerum, O.D., and Backlund, E.O. (1990). Multicenter tumor spheroids from human gliomas maintained in organ culture. *J. Neurosurg. 72*, 463–475.
10. Blanco, E., Shen, H., and Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol. 33*, 941–951.
11. Breslin, S., and O’Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discov. Today 18*, 240–249.
12. Bryce, N.S., Zhang, J.Z., Whan, R.M., Yamamoto, N., and Hambley, T.W.

(2009). Accumulation of an anthraquinone and its platinum complexes in cancer cell spheroids: The effect of charge on drug distribution in solid tumour models. *Chem. Commun.* 2673–2675.

13. Byrne, H.M. (2010). Dissecting cancer through mathematics: From the cell to the animal model. *Nat. Rev. Cancer* 10, 221–230.

14. Carrel, A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *J. Exp. Med.* 15, 516–528.

15. Carvalho, K.C., Cunha, I.W., Rocha, R.M., Ayala, F.R., Cajaíba, M.M., Begnami, M.D., Vilela, R.S., Paiva, G.R., Andrade, R.G., and Soares, F.A. (2011). GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics* 66, 965–972.

16. Chou, M.J., Hsieh, C.H., Yeh, P.L., Chen, P.C., Wang, C.H., and Huang, Y.Y. (2013). Application of open porous poly(D, L -lactide-co-glycolide) microspheres and the strategy of hydrophobic seeding in hepatic tissue cultivation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 101, 2862–2869.

17. Costa, E.C., Gaspar, V.M., Coutinho, P., and Correia, I.J. (2014). Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnol. Bioeng.* 111, 1672–1685.

18. Costa, E.C., Moreira, A.F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V.M., Carvalho, M.P., and Correia, I.J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* 34, 1427–1441.

19. Courau, T., Bonnereau, J., Chicoteau, J., Bottois, H., Remark, R., Assante Miranda, L., Toubert, A., Blery, M., Aparicio, T., Allez, M., et al. (2019). Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J. Immunother. Cancer* 7, 1–14.

20. Colella G., Fazioli F., Gallo M., De Chiara A., Apice G., Ruosi C., Cimmino A., de Nigris F. 2018. Sarcoma Spheroids and Organoids-Promising Tools in the Era of Personalized Medicine. *Int J Mol Sci.* 19(2), E615

21. St. Croix, B., Man, S., and Kerbel, R.S. (1998). Reversal of intrinsic and acquired forms of drug resistance by hyaluronidase treatment of solid tumors. *Cancer Lett.* 131, 35–44.

22. Cui, X., Hartanto, Y., and Zhang, H. (2017). Advances in multicellular spheroids formation. *J. R. Soc. Interface* 14.

23. Danilov A.O., Larin S.S., Danilova A.B., Moiseenko V.M., Balduyeva I.A., Kiselev S.L., Tourkevich Ye.A., Bartchuk A.S., Anisimov V.V., Gaftov G.I., Kochnev V.A., Hanson K.P. (2004) An improved procedure for autologous gene-modified vaccine preparation for active specific immunotherapy of disseminated solid tumors. *Voprosy onkologii.* 50(2), 219–227.

24. Debnath, J., Mills, K.R., Collins, N.L., Reginato, M.J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2002). The role of apoptosis in creating and maintaining luminal space within normal and oncogene-expressing mammary acini. *Cell* *111*, 29–40.
25. Van Dijk, M., Göransson, S.A., and Strömblad, S. (2013). Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer. *Exp. Cell Res.* *319*, 1663–1670.
26. Doix, B., Bastien, E., Rambaud, A., Pinto, A., Louis, C., Grégoire, V., Riant, O., and Feron, O. (2018). Preclinical evaluation of white led-activated non-porphyrinic photosensitizer OR141 in 3D tumor spheroids and mouse skin lesions. *Front. Oncol.* *8*, 1–9.
27. Důra, M., Němejcová, K., Jakša, R., Bártů, M., Kodet, O., Tichá, I., Michálková, R., and Dundr, P. (2019). Expression of Glut-1 in Malignant Melanoma and Melanocytic Nevi: an Immunohistochemical Study of 400 Cases. *Pathol. Oncol. Res.* *25*, 361–368.
28. Enmon, R.M., O'Connor, K.C., Lacks, D.J., Schwartz, D.K., and Dotson, R.S. (2001). Dynamics of spheroid self-assembly in liquid-overlay culture of DU 145 human prostate cancer cells. *Biotechnol. Bioeng.* *72*, 579–591.
29. Everitt B.S., Pickles A. (2004) *Statistical Aspects of the Design and Analysis of Clinical Trials*. Imperial College Press, London
30. Freshney R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications* / R.I.Freshwhney. – 6th ed., 2010. – John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA. – 732p.;
31. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A. (2009). Spheroid-based drug screen: Considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* *4*, 309–324.
32. Geraldo, S., Simon, A., and Vignjevic, D.M. (2013). Revealing the cytoskeletal organization of invasive cancer cells in 3D. *J. Vis. Exp.* 2–7.
33. Ghajar, C.M., and Bissell, M.J. (2008). Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: Insights from imaging. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 1105–1118.
34. Green, S.K., Karlsson, M.C.I., Ravetch, J. V., and Kerbel, R.S. (2002). Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: Implications for antibody-based therapeutics of cancer. *Cancer Res.* *62*, 6891–6900.
35. Gu, J., Zhao, Y., Guan, Y., and Zhang, Y. (2015). Effect of particle size in a colloidal hydrogel scaffold for 3D cell culture. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* *136*, 1139–1147.
36. Günther, S., Ruhe, C., Derikito, M.G., Böse, G., Sauer, H., and Wartenberg, M. (2007). Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells. *Cancer Lett.*

250, 25–35.

37. Haq, S., Samuel, V., Haxho, F., Akasov, R., Leko, M., Burov, S. V., Markvicheva, E., and Szewczuk, M.R. (2017). Sialylation facilitates self-assembly of 3D multicellular prostaspheres by using cyclo-RGDFK(TPP) peptide. *Onco. Targets. Ther.* *10*, 2427–2447.

38. Harris, A.L. (2002). Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 38–47.

39. Heimdal, J.H., Aarstad, H.J., Olsnes, C., and Olofsson, J. (2001). Human autologous monocytes and monocyte-derived macrophages in co-culture with carcinoma F-spheroids secrete IL-6 by a non-CD 14-dependent pathway. *Scand. J. Immunol.* *53*, 162–170.

40. Heredia-Soto V., Redondo A., Kreilinger J.J.P., Martínez-Marín V., Berjón A., Mendiola M. (2019). 3D culture modelling: An emerging approach for Translational Cancer Research in Sarcomas. *Curr Med Chem.*

41. Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* *148*, 3–15.

42. Holtfreter, J. (1943). A study of the mechanics of gastrulation. Part I. *J. Exp. Zool.* *94*, 261–318.

43. Humphreys, T. (1963). Chemical Dissolution of Sponge and Cell Adhesions. *Dev. Biol.* *8*, 27–47.

44. Ivascu, A., and Kubbies, M. (2007). Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int. J. Oncol.* *31*, 1403–1413.

45. Jang, S.H., Wientjes, M.G., and Au, J.L.S. (2001). Determinants of paclitaxel uptake, accumulation and retention in solid tumors. *Invest. New Drugs* *19*, 113–123.

46. Jensen C, Teng Y. (2020) Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* *7*, 33.

47. Jo V.Y. (2014) WHO classification of soft tissue tumours: An update based on the 2013 (4th) edition / V. Y. Jo, C. D. M. Fletcher // *Pathology.* *46*(2). – 95–104.

48. Kim, J.W., and Dang, C. V. (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Res.* *66*, 8927–8930.

49. Knuchel, R., Hofstadter, F., Jenkins, W.E.A., and Masters, J.R.W. (1989). Sensitivities of Monolayers and Spheroids of the Human Bladder Cancer Cell Line MGH-U1 to the Drugs Used for Intravesical Chemotherapy. *Cancer Res.* *49*, 1397–1401.

50. Konstantinovskiy, S., Davidson, B., and Reich, R. (2012). Ezrin and BCAR1/p130Cas mediate breast cancer growth as 3-D spheroids. *Clin. Exp. Metastasis* *29*, 527–

540.

51. Konur, A., Kreutz, M., Knüchel, R., Krause, S.W., and Andreesen, R. (1996). Three-dimensional co-culture of human monocytes and macrophages with tumor cells: Analysis of macrophage differentiation and activation. *Int. J. Cancer* *66*, 645–652.

52. Kostarelos, K., Emfietzoglou, D., Papakostas, A., Yang, W.-H., Ballangrud, Å.M., and Sgouros, G. (2005). Engineering Lipid Vesicles of Enhanced Intratumoral Transport Capabilities: Correlating Liposome Characteristics with Penetration into Human Prostate Tumor Spheroids. *J. Liposome Res.* *15*, 15–27.

53. Kozin, S. V., and Gerweck, L.E. (1998). Cytotoxicity of weak electrolytes after the adaptation of cells to low pH: Role of the transmembrane pH gradient. *Br. J. Cancer* *77*, 1580–1585.

54. L'Espérance, S., Bachvarova, M., Tetu, B., Mes-Masson, A.M., and Bachvarov, D. (2008). Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids. *BMC Genomics* *9*, 1–21.

55. Lee, B.H., Kim, M.H., Lee, J.H., Seliktar, D., Lay, N.J.C., and Tan, P. (2015). Modulation of Huh7.5 spheroid formation and functionality using modified peg-based hydrogels of different stiffness. *PLoS One* *10*, 1–20.

56. Lin, R.Z., and Chang, H.Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* *3*, 1172–1184.

57. Lin, R.Z., Chou, L.F., Chien, C.C.M., and Chang, H.Y. (2006). Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: Roles of E-cadherin and β 1-integrin. *Cell Tissue Res.* *324*, 411–422.

58. Liu, Z., and Vunjak-Novakovic, G. (2016). Modeling tumor microenvironments using custom-designed biomaterial scaffolds. *Curr. Opin. Chem. Eng.* *11*, 94–105.

59. Liu, J., Tan, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Xu, P., Chen, J., Poh, Y., Tang, K., Wang, N., and Huang, B. (2012). Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nat. Mater.* *11*, 734–741.

60. Lu, S., Zhao, F., Zhang, Q., and Chen, P. (2018). Therapeutic peptide amphiphile as a drug carrier with ATP-triggered release for synergistic effect, improved therapeutic index, and penetration of 3D cancer cell spheroids. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1–14.

61. Lv, X., Li, J., Zhang, C., Hu, T., Li, S., He, S., Yan, H., Tan, Y., Lei, M., Wen, M., et al. (2017). The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes Dis.* *4*, 19–24.

62. Madsen, S.J., Sun, C.-H., Tromberg, B.J., Yeh, A.T., Sanchez, R., and Hirschberg, H. (2002). Effects of Combined Photodynamic Therapy and Ionizing Radiation on

Human Glioma Spheroids]. *Photochem. Photobiol.* 76, 411.

63. Majety, M., Pradel, L.P., Gies, M., and Ries, C.H. (2015). Fibroblasts influence survival and therapeutic response in a 3D co-culture model. *PLoS One* 10, 1–18.

64. Martin, A.R., Ronco, C., Demange, L., and Benhida, R. (2017). Hypoxia inducible factor down-regulation, cancer and cancer stem cells (CSCs): ongoing success stories. *Medchemcomm* 8, 21–52.

65. Mayer, B., Klement, G., Kaneko, M., Man, S., Jothy, S., Rak, J., and Kerbel, R.S. (2001). Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* 121, 839–852.

66. Mehta, G., Hsiao, A.Y., Ingram, M., Luker, G.D., and Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Control. Release* 164, 192–204.

67. Menakuru, S.R., Brown, N.J., Staton, C.A., and Reed, M.W.R. (2008). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Br. J. Cancer* 99, 1961–1966.

68. Minchinton, A.I., and Tannock, I.F. (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* 6, 583–592.

69. Miranti, C.K., and Brugge, J.S. (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction Early studies on the regulation of cell behaviour by adhesion. *Nat. Cell Biol.* 4.

70. Mori, Y., Yamawaki, K., Ishiguro, T., Yoshihara, K., Ueda, H., Sato, A., Ohata, H., Yoshida, Y., Minamino, T., Okamoto, K., et al. (2019). ALDH-Dependent Glycolytic Activation Mediates Stemness and Paclitaxel Resistance in Patient-Derived Spheroid Models of Uterine Endometrial Cancer. *Stem Cell Reports* 13, 730–746.

71. Moscona, A., and Moscona, H. (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J. Anat.* 86, 287–301.

72. Mueller-Klieser, W. (1984). Method for the determination of oxygen consumption rates and diffusion coefficients in multicellular spheroids. *Biophys. J.* 46, 343–348.

73. Nath, S., and Devi, G.R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* 163, 94–108.

74. Oudar, O. (2000). Spheroids: Relation between tumour and endothelial cells. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36, 99–106.

75. Pathi, S.P., Kowalczewski, C., Tadipatri, R., and Fischbach, C. (2010). A novel 3-D mineralized tumor model to study breast cancer bone metastasis. *PLoS One* 5, 1–10.

76. Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423–1437.

77. Rama-Esendagli, D., Esendagli, G., Yilmaz, G., and Guc, D. (2014). Spheroid formation and invasion capacity are differentially influenced by co-cultures of fibroblast and macrophage cells in breast cancer. *Mol. Biol. Rep.* *41*, 2885–2892.
78. De Ridder, L., Cornelissen, M., and De Ridder, D. (2000). Autologous spheroid culture: A screening tool for human brain tumour invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *36*, 107–122.
79. Rimann, M., and Graf-Hausner, U. (2012). Synthetic 3D multicellular systems for drug development. *Curr. Opin. Biotechnol.* *23*, 803–809.
80. Rodríguez-Enríquez, S., Gallardo-Pérez, J.C., Avilés-Salas, A., Marín-Hernández, A., Carreño-Fuentes, L., Maldonado-Lagunas, V., and Moreno-Sánchez, R. (2008). Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J. Cell. Physiol.* *216*, 189–197.
81. Sachs, N., and Clevers, H. (2014). Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *24*, 68–73.
82. Shao H, Moller M, Wang D, Ting A, Boulina M, Liu ZJ. (2020) A Novel Stromal Fibroblast-Modulated 3D Tumor Spheroid Model for Studying Tumor-Stroma Interaction and Drug Discovery. *J Vis Exp.* 156.
83. Shi, C., Cao, H., He, W., Gao, F., Liu, Y., and Yin, L. (2015). Novel drug delivery liposomes targeted with a fully human anti-VEGF165 monoclonal antibody show superior antitumor efficacy in vivo. *Biomed. Pharmacother.* *73*, 48–57.
84. Smyrek, I., Mathew, B., Fischer, S.C., Lissek, S.M., Becker, S., and Stelzer, E.H.K. (2019). E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. *Biol. Open* *8*.
85. Sutherland, R.M., and Mccredie, J.A. (1971). Growth of Multicell Spheroids in Tissue Culture as a Model of Nodular Carcinomas<xref ref-type="fn" rid="FN2">2</xref>. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 113–120.
86. Sutherland, R.M., Inch, W.R., McCredie, J.A., and Kruuv, J. (1970). A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int. J. Radiat. Biol.* *18*, 491–495.
87. T Christensen, J Moan, T Sandquist, L.S. (1984). Multicellular Spheroids as an in Vitro Model System for Photoradiation Therapy in the Presence of Hpd - PubMed.
88. Talukdar, S., and Kundu, S.C. (2012). A non-mulberry silk fibroin protein based 3D in vitro tumor model for evaluation of anticancer drug activity. *Adv. Funct. Mater.* *22*, 4778–4788.
89. Tannock, I.F., and Rotin, D. (1989). Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation. *Cancer Res.* *49*, 4373–4384.

90. Themistocleous, G.S., Katopodis, H., Sourla, A., Lembessis, P., Doillon, C.J., Soucacos, P.N., and Koutsilieris, M. (2004). Three-dimensional type I collagen cell culture systems for the study of bone pathophysiology. *In Vivo (Brooklyn)*. *18*, 687–696.
91. Trédan, O., Galmarini, C.M., Patel, K., and Tannock, I.F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* *99*, 1441–1454.
92. Trikha, M., Zhou, Z., Nemeth, J.A., Chen, Q., Sharp, C., Emmell, E., Giles-Komar, J., and Nakada, M.T. (2004). CNTO 95, a fully human monoclonal antibody that inhibits αv integrins, has antitumor and antiangiogenic activity in vivo. *Int. J. Cancer* *110*, 326–335.
93. Vogel, S., Peters, C., Etminan, N., Börger, V., Schimanski, A., Sabel, M.C., and Sorg, R. V (2013). Biochemical and Biophysical Research Communications Migration of mesenchymal stem cells towards glioblastoma cells depends on hepatocyte-growth factor and is enhanced by aminolaevulinic acid-mediated photodynamic treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *431*, 428–432.
94. Weiswald, L.B., Richon, S., Validire, P., Briffod, M., Lai-Kuen, R., Cordelières, F.P., Bertrand, F., Dargere, D., Massonnet, G., Marangoni, E., et al. (2009). Newly characterised ex vivo colospheres as a three-dimensional colon cancer cell model of tumour aggressiveness. *Br. J. Cancer* *101*, 473–482.
95. Weiswald, L.B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia (United States)* *17*, 1–15.
96. Weng, K.C., Hashizume, R., Noble, C.O., Serwer, L.P., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Kuwabara, A.M., Chao, L.X., Chen, F.F., James, C.D., et al. (2013). Convection-enhanced delivery of targeted quantum dot-immunoliposome hybrid nanoparticles to intracranial brain tumor models. *Nanomedicine* *8*, 1913–1925.
97. West, C.M.L., and Moore, J. V. (1989). Flow Cytometric Analysis of Intracellular Hematoporphyrin Derivative in Human Tumor Cells and Multicellular Spheroids. *Photochem. Photobiol.* *50*, 665–669.
98. Wu T, Dai Y. Tumor Microenvironment and Therapeutic Response. (2017). *Cancer Lett* . *387*, 61–68.
99. Ying, X., Wen, H., Lu, W.L., Du, J., Guo, J., Tian, W., Men, Y., Zhang, Y., Li, R.J., Yang, T.Y., et al. (2010). Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *J. Control. Release* *141*, 183–192.
100. Yokoi, K., Tanei, T., Godin, B., van de Ven, A.L., Hanibuchi, M., Matsunoki, A., Alexander, J., and Ferrari, M. (2014). Serum biomarkers for personalization of nanotherapeutics-based therapy in different tumor and organ microenvironments. *Cancer Lett.* *345*, 48–55.
101. Young, S.R., Saar, M., Santos, J., Nguyen, H.M., Vessella, R.L., and Peehl, D.M.

(2013). Establishment and serial passage of cell cultures derived from LuCaP xenografts. *Prostate* 73, 1251–1262.

102. Yuhás, J.M., Tarleton, A.E., and Molzen, K.B. (1978). Multicellular Tumor Spheroid Formation by Breast Cancer Cells Isolated from Different Sites. *Cancer Res.* 38, 2486–2491.

103. Zhu, C., Sempkowski, M., Holleran, T., Linz, T., Bertalan, T., Josefsson, A., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., and Sofou, S. (2017). Alpha-particle radiotherapy: For large solid tumors diffusion trumps targeting. *Biomaterials* 130, 67–75.

104. Ziskin, M.C. (1983). Growth of Mammalian Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Res.* 43, 556–560.