

Е.А. Просекина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева

Создание трёхмерных клеточных моделей для решения теоретических и практических задач современной онкологии

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России»,
Санкт-Петербург

Злокачественная опухоль представляет собой многокомпонентную пространственно сложно организованную систему, которая характеризуется индивидуальными особенностями для каждого пациента. Создание клеточной модели *in vitro*, максимально приближенной по структуре и свойствам к естественной опухолевой системе, позволит приблизиться к решению таких практических и теоретических задач современной онкологии, как выявление биологических закономерностей опухолевого роста, особенностей поведения клеток иммунной системы, тестирование потенциальных противоопухолевых препаратов, определение эффективности методов химио-, радио-, фотодинамической, таргетной и иммунотерапии. Такой моделью могут служить трёхмерные клеточные структуры — сфероиды (тумороиды). В обзоре представлены данные об особенностях трехмерного клеточного моделирования, характеристиках существующих 3D моделей и их пригодности в экспериментальных и клинических исследованиях.

Ключевые слова: сфероиды, тумороиды, солидные опухоли, 3D-клеточное моделирование

Злокачественная опухоль представляет собой многокомпонентную пространственно сложно организованную систему, которая характеризуется индивидуальными особенностями для каждого пациента, поэтому в контексте решения практических и теоретических задач современной онкологии, таких как выявление закономерностей опухолевого роста, тестирование потенциальных противоопухолевых препаратов, необходимо создание такой модели, которая была бы максимально приближена по структуре и свойствам к естественной опухолевой системе. Такой моделью могут служить трёхмерные (3D) клеточные структуры — сфероиды (тумороиды).

Впервые метод получения сфероидов был описан при изучении эмбрионов амфибий Иоганесом Холтфретером в 1944 г. [31]. Он ис-

следовал самоорганизацию эктодермальных, мезодермальных и энтодермальных зародышевых листков относительно друг друга в сферы и отметил, что происходит не просто объединение клеток, а их закономерное распределение в пространстве. В дальнейшем было обнаружено, что нормальные клетки организма в определенных условиях культивирования тоже могут быть способны к спонтанному сфероидообразованию. В частности, Y. Nishikawa et al. (1996) наблюдали спонтанную агрегацию иммортализованных эпителиальных клеток в процессе длительного культивирования первичных гепатоцитов мыши [55]. Аналогичные результаты были получены G.H. Lee et al. (1999) в процессе экспериментальной работы с клеточной линией эпителиальных клеток MLEC10, полученной из интактной печени мышей C3H/HeN [44]. Первые работы по изучению сфероидообразования клетками солидных опухолей показали интересные результаты, указывающие на генетическое детерминирование злокачественных клеток в процессе опухолевой прогрессии. Так, в исследовании J.M. Vugas et al. (1978) 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 [75].

Характеристика опухолевых сфероидов

Опухолевые 3D-сфероиды — это микроразмерные клеточные агрегаты, использующиеся для тканевого моделирования *in vitro* злокачественных новообразований с целью имитации их свойств. Подобные структуры описаны для рака легкого [3], шейки матки [16], поджелудочной железы [62], предстательной железы [78, 77], молочной железы [16], колоректального рака [49]. Можно считать, что сфероиды представляют собой микромодель опухоли, в которой клетки, ее составляющие, сходны по морфологии, профилю продуцируемых биологических веществ и составу рецепторов с клетками зло-

качественных новообразований, развивающихся в организме [13, 19]. Реально генерировать сфероиды из различных типов злокачественных и стромальных клеток и культивировать их в течение длительного периода времени.

Было обнаружено, что подобно солидным опухолям, сфероиды характеризуются определенной клеточной зональностью, присутствие которой становится более выраженной с увеличением размера сфероида. Обычно можно выявить внешний слой, представленный быстро пролиферирующими клетками, средний слой со стареющими или покоящимися клетками, и внутренний слой, содержащий некротические клетки [52]. Размер сфероидов может составлять от 100 до 1000 мкм, причем сфероиды с радиусом от 200 микрометров и более будут иметь пролиферирующую и покоящуюся зоны, тогда как значительно большие по радиусу сфероиды могут также содержать некротическую зону из-за недостатка питательных веществ и ограничения транспорта кислорода [32].

Интересно, что во внутренней части сфероида микросреда подкисляется (диапазон pH 6,5–7,2) за счёт того, что в состоянии гипоксии опухолевые клетки активно преобразуют пируват в лактат [1], и это явление аналогично эффекту Варбурга, связанному с накоплением лактата в солидных опухолях [35, 70]. В ответ на низкий уровень pH окружающей среды клетки стареющей и некротической зон начинают активно продуцировать факторы, способствующие усилению пролиферации злокачественных клеток и их выживанию [28, 73]. Примером такого фактора является индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1). При достижении определенной концентрации в клетке, активный димер HIF-1 α перемещается в ядро, где активирует экспрессию более чем 200 генов, ответственных за формирование устойчивости к ишемии и гипоксии [51, 34].

Процесс формирования сфероида состоит как минимум из трёх фаз: первоначальная агрегация изолированных клеток, уплотнение сфероида и его рост [45, 61]. Клетки в сфероидах, как и в опухолях, депонируют компоненты внеклеточного матрикса: коллаген IV, ламинин, фибронектин, протеогликаны, тенасцин и др. [12]. Тесное физическое взаимодействие между опухолевыми клетками и внеклеточным матриксом за счёт α 5- и β 1-интегринов [54] и контакты между опухолевыми клетками за счёт E-кадгеринов [33, 64] увеличивают плотность сфероида и создают определенный барьер для проникновения и распределения веществ, поступающих извне [68, 70]. Помимо этого, вклад в образование трёхмерных структур также вносят внутриклеточные компоненты, такие как актин и микротрубочки [71, 84].

Кинетика роста тумороидов *in vitro* сходна с кинетикой роста солидных опухолей. Начальный период роста солидных опухолей называют фазой бессосудистого роста; в этот период объем опухоли увеличивается в геометрической прогрессии, затем наступает состояние покоя, после которого следует фаза образования новых сосудов, вызванная действием ангиогенных факторов — например, ангиогенина и сосудистого эндотелиального фактора роста [59, 76]. Под действием матриксных металлопротеиназ (ММР-2, ММР-9) происходит ремоделирование внеклеточного матрикса, и опухолевые клетки приобретают способность к инвазии и метастазированию [72]. В процессе роста тумороидов их объем экспоненциально увеличивается, далее по достижении размера 200–500 мкм в диаметре скорость роста уменьшается и выходит на плато, таким образом рост сфероидов соответствует начальной фазе роста опухолевого узла [11, 16].

В сфероиде можно моделировать не только гомотипические, но и гетеротипические взаимодействия. Такие взаимодействия получают путём кокультивирования опухолевых клеток со стромальными фибробластами, эндотелиальными клетками, мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), с клетками иммунной системы и др. [42, 56, 18, 23, 29]. Гетеросфероиды способны воспроизводить тесные и сложные взаимодействия «клетка-клетка» и «клетка-матрикс», которые присутствуют в опухолях в естественных условиях [41]. Подобные гетеросистемы можно использовать для скрининга противоопухолевых препаратов, для оценки их воздействия на опухолевые и нормальные клетки.

Получение сфероидов

Получение трёхмерных клеточных культур базируется на фундаментальном принципе, который заключается в предотвращении прикрепления клеток к поверхности культуральной посуды. Способы получения сфероидов можно разделить на две группы — создание сфероидов с использованием специальных матриц-носителей (скаффолдов) и без их использования. Эффективность получения сфероидов зависит от таких критериев, как длительность их формирования, однородность размеров, пригодность для последующих применений, качество использованных материалов и оборудования.

Скаффолды представляют собой твёрдые каркасы (губки или пены), гидрогели, волокна или шарики, которые могут быть получены с различными оптимальными химическими и механическими характеристиками, для того чтобы имитировать внеклеточный матрикс опухоли *in vivo* [16, 70, 76]. Скаффолды создают в основ-

ном с использованием неадгезивных полимеров (например, агарозы, коллагена, альгината, гиалуроновой кислоты и др.) или смеси неадгезивных полимеров с другими биоматериалами [84, 59]. Именно неадгезивные свойства скаффолда играют решающую роль в сфероидообразовании. Когда клетки помещают на поверхность или в сам скаффолд, они оседают на нём, силы адгезии между клетками начинают преобладать, клетки мигрируют внутрь, образуя «микроткань» в ячейках скаффолда [71].

Методы без использования скаффолдов основаны на получении сфероидов в неадгезивных условиях. Самый распространенный, дешевый и простой метод — метод «висячей капли» (*hanging drop method*), при котором клеточную суспензию помещают на крышку чашки Петри, а затем клетки спонтанно агрегируют на дне капли культуральной среды, получая сфероиды [9]. Ещё одним довольно распространенным методом является использование поверхностей, сформированных неадгезивными полимерами, например, агарозой или гиалуроновой кислотой (*liquid overlay technique*) [15]. Также разработаны методы получения сфероидов при помощи биореакторов и предварительной обработкой культур циклическими пептидами (*cyclo-RGDfK(TPP)*) [25, 27].

Применение метода культивирования сфероидов

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 [49].

Первое сообщение об использовании сфероидов в качестве модельной системы *in vitro* для ФДТ было сделано в 1984 г. Т. Christensen et

al. [14]. Ранние исследования были сосредоточены главным образом на оценке распределения гематопорфиринов (Hpd) в различных моделях сфероидов и эффектов ФДТ [80]. С.М. West et al. (1992) продемонстрировали, что сфероиды карциномы толстой кишки человека более устойчивы к ФДТ с Hpd по сравнению с монослойными культурами, и что чувствительность к ФДТ снижается с увеличением размера сфероида [81].

В более современных исследованиях сфероиды были использованы в качестве модели для исследования кинетики диффузии ряда фотосенсибилизаторов нового поколения. Так, В. Doix et al. (2018) исследовали действие фотосенсибилизатора OR141 на сфероиды, полученные из клеток меланомы мыши B16 и эпидермоидной карциномы человека A431, и определили пороговые значения диффузии OR141 в опухолевые сфероиды, которые индуцировали гибель клеток в их внутренних слоях [20].

S. Vogel et al. (2013) продемонстрировали усиленную миграцию МСК к опухолевым клеткам, предварительно подвергнутых ФДТ в сочетании с обработкой 5-аминолевулиновой кислотой (ALA/PDT) [74]. 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 [6, 60].

Интерес к опухолевым сфероидом в области радиобиологии был впервые продемонстрирован в работах R.M. Sutherland et al. (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* [66, 67].

На сегодняшний день в лучевой терапии злокачественных опухолей активно разрабаты-

ваются 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. [63, 79, 85]. 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⁻-MCF₇ позволило С. Zhu et al. (2017) разработать способ более эффективного проникновения радионуклидных носителей в ткань опухоли [85]. 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, фармакокинетических 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 et al. (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 сверхэкспрессии генов, ответственных за остановку клеточного цикла, а также за репарацию и репликацию ДНК (*BRC1*, *BRC2*, *DDB2*, *FANCA*) [43]. При этом подобная сверхэкспрессия генов не наблюдалась в монослойных культурах. Согласно мнению многих исследователей, сфероиды оказались особенно ценной моделью в исследовании ответа опухолевых клеток на химиотерапию и радиотерапию [30].

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 [10, 38, 82]. В частности, А.И. 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 [53]. 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 [65]. Ещё одна стратегия связана с плотностью «упаковки» сфероидов: сфероиды, полученные из клеточной сублинии рака толстой кишки человека НСТ-8, не экспрессировали молекулы адгезии α -Е катенина 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 [40].

Было также обнаружено, что из-за pH-градиентов, существующих внутри сфероидов, клетки некротической зоны могут быть защищены от цитотоксического действия слабых кислотных препаратов, таких как митоксантроны и антрациклины, тогда как действие слабощелочных препаратов, таких как хлорамбуцил и митомицин С, усиливается [36, 39, 69].

За последние десятилетия одним из подходов к улучшению 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 [2, 83]. 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 [8, 24]. S. Lu et al. (2018) использовали сфероиды, полученные из линии карциномы легкого человека A549, для оценки проникновения в опухоль наноконъюгата доxorубина (Dox), интеркалируемого в каркас ДНК, включающий АТФ-связывающий аптамер, с катионным пептидным амфифилом РАН6 [47]. При попадании в опухоль доxorубин высвобождался из наноконъюгата в среде, обогащенной АТФ. Было обнаружено, что комплекс 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 [41, 21, 22, 46]. Так, S. Gunther et al. (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 ММР-9, участвующей в ремоделировании внеклеточного матрикса [26].

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 et al. (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 [50]. 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 [7]. N. Beak et al. (2016) использовали 3D-систему культивирования клеточной линии остеосаркомы U-2OS для мониторинга воздействия доxorубина [4] и цисплатина [5]. 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 [37]. 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 малигнизирован-

ных клеток по сравнению с культурой моно-сфероидов 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 [58].

T. Courau et al. (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* [17]. В этом исследовании удалось показать, что аллогенные Т- и НК-клетки быстро инфильтрируют сфероиды, вызывая иммуноопосредованный апоптоз опухолевых клеток и разрушение сфероида. 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.

Заключение

Чёткое понимание сложных механизмов, влияющих на эффективность противоопухолевой терапии, имеет важное значение для современной онкологии. По сравнению с 2D-культурой сфероиды более точно имитируют нативные ткани, повторяя их архитектуру, спектр растворимых веществ, экспрессию ряда рецепторов, сложные взаимодействия клеток между собой, а также клеток с внеклеточным матриксом. В литературе публикуется все больше исследований, в которых подчеркиваются преимущества трехмерных моделей различных тканей *in vitro*. Последние достижения показывают, что сфероиды помогут преодолеть разрыв между доклиническими и клиническими исследованиями, предоставляя соответствующую модель злокачественных новообразований человека *in vitro*, полезную для тестирования различных терапевтических методов воздействия на опухоль, изу-

чения механизмов инвазии и метастазирования, процессов функционирования иммунной системы в условиях опухолевого роста.

На сегодняшний день молекулярные характеристики опухолевых сфероидов отдельных пациентов используются уже в качестве платформ для автоматизированного скрининга лекарств при поиске новых биомаркеров и потенциальных мишеней [57]. Однако сохраняются серьезные проблемы в разработке методов тестирования эффективности определенных видов терапии на основе сложных многокомпонентных сфероидов. Дальнейшие достижения в направлении создания моделей и технологий персонализированной медицины, несомненно, преодолеют эти препятствия и смогут улучшить прогностическую ценность доклинических исследований, что будет способствовать прогрессу эффективной терапии злокачественных новообразований.

Обзор написан при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-29-09014/18 от 04.09.2018.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alfaro K.O., Verduzco D., Rauch C. et al. Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question // *Oncoscience*. — 2014. — Vol. 1. — №.12. — P. 777-802.
2. Allen T.M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy // *Nature Reviews Cancer*. — 2002. — Vol. 2. — № 10. — P. 750-763.
3. Amann A., Zwierzina M., Gameraith G. et al. Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour — stroma interactions in non-small cell lung cancer cells // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9. — № 3. — P. e92511.
4. Baek N., Seo O.W., Kim M. et al. Monitoring the effects of doxorubicin on 3D-spheroid tumor cells in real-time // *OncoTargets and Therapy*. — 2016. — Vol. 9. — P. 7207-7218.
5. Baek N., Seo O.W., Lee J. Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells // *Drug Design, Development and Therapy*. — 2016. — Vol. 10. — P. 2155-2165.
6. Bai C., Yang M., Fan Z. et al. Associations of chemo- and radio-resistant phenotypes with the gap junction, adhesion and extracellular matrix in a three-dimensional culture model of soft sarcoma // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. — 2015. — Vol. 34. — № 1. — P. 1-10.
7. Bartling B., Hofmann H.-S., Silber R.-E., Simm A. Differential impact of fibroblasts on the efficient cell death of lung cancer cells induced by paclitaxel and cisplatin // *Cancer Biology & Therapy*. — 2008. — Vol. 7. — № 8. — P. 1250-1261.
8. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery // *Nature Biotechnology*. — 2015. — Vol. 33. — № 9. — P. 941-951.

9. Breslin S., O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery // *Drug Discovery Today*. — 2013. — Vol. 18. — № 5-6. — P. 240-249.
10. Bryce N.S., Zhang J.Z., Whan R.M. et al. Accumulation of an anthraquinone and its platinum complexes in cancer cell spheroids: the effect of charge on drug distribution in solid tumour models // *Chemical Communications*. — 2009. — Vol. 19. — P. 2673-2675.
11. Byrne H.M. Dissecting cancer through mathematics: from the cell to the animal model // *Nature Reviews Cancer*. — 2010. — Vol. 10. — № 3. — P. 221-230.
12. Chan H.F., Zhang Y., Ho Y.-P. et al. Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment // *Scientific Reports*. — 2013. — Vol. 3. — № 1. — P. 3462.
13. Chignola R., Schenetta A., Chiesa E. et al. Oscilating growth patterns of multicellular tumor spheroids // *Cell Proliferation*. — 1999. — № 32. — P. 39-48.
14. Christensen T., Moan J., Sandquist T., Smedshammer L. Multicellular spheroids as an in vitro model system for photoradiation therapy in the presence of Hpd // *Progress in clinical and biological research*. — 1984. — Vol. 170. — P. 381-390.
15. Costa E.C., de Melo-Diogo D., Moreira A.F. et al. Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches // *Biotechnology Journal*. — 2018. — Vol. 13. — № 1. — P. 1-25.
16. Costa E.C., Gaspar V.M., Coutinho P., Correia I.J. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models // *Biotechnology and Bioengineering*. — 2014. — Vol. 111. — № 10. — P. 1672-1685.
17. Courau T., Bonnereau J., Chicoteau J. et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment // *Journal for Immunotherapy of Cancer*. — 2019. — Vol. 7. — № 1. — P. 1-14.
18. de Ridder L., Cornelissen M., de Ridder D. Autologous spheroid culture: a screening tool for human brain tumour invasion // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. — 2000. — Vol. 36. — № 2. — P. 107-122.
19. Deakin A.S. Model for the growth of a solid in vitro tumor // *Growth*. — 1975. — Vol. 39. — P. 159-165.
20. Doix B., Bastien E., Rambaud A. et al. Preclinical Evaluation of White Led-Activated Non-porphyrinic Photosensitizer OR141 in 3D Tumor Spheroids and Mouse Skin Lesions // *Frontiers in Oncology*. — 2018. — Vol. 8. — P. 1-9.
21. Friedrich J., Ebner R., Kunz-Schughart L.A. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids — old hat or new challenge? // *International Journal of Radiation Biology*. — 2007. — Vol. 83. — № 11-12. — P. 849-871.
22. Friedrich J., Seidel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach // *Nature Protocols*. — 2009. — Vol. 4. — № 3. — P. 309-324.
23. Furbert-Harris P.M., Laniyan I., Harris D. et al. Activated eosinophils infiltrate MCF-7 breast multicellular tumor spheroids // *Anticancer research*. — 2003. — Vol. 23. — № 1A. — P. 71-78.
24. Goodman T.T., Olive P.L., Pun S.H. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids // *International Journal of Nanomedicine*. — 2007. — Vol. 2. — P. 265-274.
25. Guller A.E., Grebenyuk P.N., Shekhter A.B. et al. Bioreactor-Based Tumor Tissue Engineering // *Acta Naturae*. — 2016. — Vol. 8. — № 3. — P. 44-58.
26. Günther S., Ruhe C., Derikito M. G. et al. Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells // *Cancer Letters*. — 2007. — Vol. 250. — № 1. — P. 25-35.
27. Haq S., Samuel V., Haxho F. et al. Sialylation facilitates self-assembly of 3D multicellular prostaspheres by using cyclo-RGDfK(TPP) peptide // *OncoTargets and Therapy*. — 2017. — Vol. 10 — P. 2427-2427.
28. Harris A.L. Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth // *Nature Reviews Cancer*. — 2002. — Vol. 2. — № 1. — P. 38-47.
29. Heimdal J.H., Aarstad H.J., Olsnes C., Olofsson J. Human autologous monocytes and monocyte-derived macrophages in co-culture with carcinoma F-spheroids secrete IL-6 by a non-CD14-dependent pathway // *Scandinavian Journal of Immunology*. — 2001. — Vol. 53. — № 2. — P. 162-170.
30. Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C. et al. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again // *Journal of Biotechnology*. — 2010. — Vol. 148. — № 1. — P. 3-15.
31. Holtfrete J. A study of the mechanics of gastrulation // *J. Exp. Zool.* — 1944. — Vol. 95. — P. 171-212.
32. Ivanov D. P., Parker T. L., Walker D. A. et al. Multiplexing Spheroid Volume, Resazurin and Acid Phosphatase Viability Assays for High-Throughput Screening of Tumour Spheroids and Stem Cell Neurospheres // *PLoS ONE*. — 2014. — Vol. 9. — № 8. — P. e103817.
33. Ivascu A., Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids // *International Journal of Oncology*. — 2007. — Vol. 31. — P. 1403-1413.
34. Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F. et al. Cellular and developmental control of O₂ of hypoxia-inducible factor 1 // *Genes & Development*. — 1998. — Vol. 12. — № 2. — P. 149-162.
35. Kim J., Dang, C.V. Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect // *Cancer Research*. — 2006. — Vol. 66. — № 18. — P. 8927-8930.
36. Knuchel R., Hofstadter F., Jenkins W.E., Masters J.R. Sensitivities of monolayers and spheroids of the human bladder cancer cell line MGH-U1 to the drugs used for intravesical chemotherapy // *Cancer Research*. — 1989. — Vol. 49. — P. 1397-1401.
37. Konur A., Kreutz M., Knuchel R. et al. Three-dimensional co-culture of human monocytes and macrophages with tumor cells: analysis of macrophage differentiation and activation // *International Journal of Cancer*. — 1996. — Vol. 66. — № 5. — P. 645-652.
38. Kostarelos K., Emfietzoglou D., Papakostas A. Sgouros, Engineering lipid vesicles of enhanced intratumoral transport capabilities: correlating liposome characteristics with penetration into human prostate tumor spheroids // *Journal of Liposome Research*. — 2005. — Vol. 15. — № 1. — P. 15-27.
39. Kozin S.V., Gerweck L.E. Cytotoxicity of weak electrolytes after the adaptation of cells to low pH: role of the transmembrane pH gradient // *British Journal of Cancer* — 1998. — Vol. 77. — № 10. — P. 1580-1585.
40. Kuh H.J., Jang S.H., Wientjes M. G. et al. Determinants of paclitaxel penetration and accumulation in human sol-

- id tumor // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. –1999. — Vol. 290. — № 2. — P. 871-880.
41. Kunz-Schughart L.A., Freyer J.P., Hofstaedter F., Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model // *Journal of Biomolecular Screening*. — 2004. — Vol. 9. — № 4. — P. 273-285.
 42. Kunz-Schughart L.A., Kreutz M., Knuechel R. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology // *International Journal of Experimental Pathology*. — 1998. — Vol. 79. — № 1. — P. 1-23.
 43. L'Espérance S., Bachvarova M., Tetu B. et al. Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids // *BMC Genomics*. — 2008. — Vol. 9. — № 1. — P. 99.
 44. Lee H., Osanai M., Tokusashi V. Morphology, proliferation and apoptosis of mouse liver epithelial cells cultured as spheroids // *Japanese Journal of Cancer Research*. — 1999. — Vol. 90. — № 10. — P. 1109-1116.
 45. Lin R.Z., Chou L.-F., Chien C.-C.M., Chang H.-Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and α 1-integrin // *Cell and Tissue Research*. — 2006. — Vol. 324. — № 3. — P. 411-422.
 46. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // *Biotechnology Journal*. — 2008. — Vol. 3. — № 9-10. — P. 1172-1184.
 47. Lu S., Zhao F., Zhang Q., Chen, P. Therapeutic Peptide Amphiphile as a Drug Carrier with ATP-Triggered Release for Synergistic Effect, Improved Therapeutic Index, and Penetration of 3D Cancer Cell Spheroids // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2018. — Vol. 19. — № 9. — P. 1-14.
 48. Ludwig K., Tse E.S., Wang J.Y. Colon cancer cells adopt an invasive phenotype without mesenchymal transition in 3-D but not 2-D culture upon combined stimulation with EGF and crypt growth factors // *BMC Cancer*. — 2013. — Vol. 13. — P. 221.
 49. Madsen S.J., Sun C.-H., Tromberg B.J. et al. Effects of combined photodynamic therapy and ionizing radiation on human glioma spheroids // *Photochemistry and Photobiology*. — 2002. — Vol. 76. — № 4. — P. 411-416.
 50. Majety M., Pradel L.P., Gies M., Ries C.H. Fibroblasts influence survival and therapeutic response in a 3D co-culture model // *PLoS One*. — 2015. — Vol. 10. — P. e0127948.
 51. Martin A. R., Ronco C., Demange L., Benhida R. Hypoxia inducible factor down-regulation, cancer and cancer stem cells (CSCs): ongoing success stories // *MedChemComm*. — 2017. — Vol. 8. — № 1. — P. 21-52.
 52. Mehta G., Hsiao A.Y., Ingram M., Luker G.D., Takayama S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy // *Journal of Controlled Release*. — 2012. — Vol. 164. — № 2. — P.192-204.
 53. Minchinton, A.I., Tannock, I.F. Drug penetration in solid tumours // *Nature Reviews Cancer*. — 2006. — Vol. 6. — № 8. — P. 583-592.
 54. Miranti C.K., Brugge J.S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction // *Nature Cell Biology*. — 2002. — Vol. 4. — № 4. — P. 83-90.
 55. Nichikawa V., Torkusashi V., Kodahama T. et al. Hepatocytic cells form bile duct-like structures within a three-dimensional collagen gel matrix // *Experimental Cell Research*. — 1996. — № 223. — P. 357-371.
 56. Oudar O. Spheroids: relation between tumour and endothelial cells // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. — 2000. — Vol. 36. — № 2. — P. 99-106.
 57. Pauli C., Hopkins B.D., Prandi D. et al. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine // *Cancer Discovery*. — 2017. — Vol. 7. — № 5. — P. 462-477.
 58. Quail D.F., Joyce J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis // *Nature Medicine*. — 2013. — Vol. 19. — № 11. — P. 1423-1437.
 59. Raica M., Cimpean A.M., Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions // *European Journal of Cancer*. — 2009. — Vol. 45. — № 11. — P. 1924-1934.
 60. Sachs N., Clevers H. Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes // *Current Opinion in Genetics & Development* — 2014. — Vol. 24. — P. 68-73.
 61. Schwartz D.K., Dotson R.S. Dynamics of spheroid self-assembly in liquid-overlay culture of DU 145 human prostate cancer cells // *Biotechnology and Bioengineering*. —2001. — Vol. 72. — № 6. — P. 579-591.
 62. Shankar S., Nall D., Tang S.-N. et al. Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6. — P. e16530.
 63. Shi C., Cao H., He W. et al. Novel drug delivery liposomes targeted with a fully human anti-VEGF165 monoclonal antibody show superior antitumor efficacy in vivo // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. — 2015. — Vol. 73. — P. 48-57.
 64. Smyrek I., Mathew B., Fischer S.C. et al. E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity // *Biol Open*. — 2019. — Vol. 8. — № 1.
 65. St Croix B., Man S., Kerbel R.S. Reversal of intrinsic and acquired forms of drug resistance by hyaluronidase treatment of solid tumors // *Cancer Letters*. — 1998. — Vol. 131. — № 1. — P. 35-44.
 66. Sutherland R.M., Durand R.E., Jones W.B.G. Modification by triacetoneamine-N-oxyl (TAN) of the radiation response of chinese hamster cells grown as a tumor model // *Radiation Research*. — 1971. — Vol. 47. — P. 342.
 67. Sutherland R.M., Inch W.R., McCredie J.A., Kruuv J. A multicomponent radiation survival curve using an in vitro tumour model // *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. — 1970. — Vol. 18. — № 5. — P. 491-495.
 68. Tannock I.F., Lee C.M., Tunggal J.K. et al. Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy // *Clinical Cancer Research*. — 2002. — Vol. 8. — P. 878-884.
 69. Tannock I.F., Rotin D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation // *Cancer Research*. —1989. — Vol. 49. — № 16. — P. 4373-4384.
 70. Tredan O., Galmarini C.M., Patel K., Tannock I.F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. — 2007. — Vol. 99. — P. 1441-1454.
 71. Tzanakakis E.S., Hansen L.K., Hu W.-S. The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid

- self-assembly // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. — 2001. — Vol. 48. — P. 175-189.
72. van Dijk M., Göransson S.A., Strömblad S. Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer // *Experimental Cell Research*. — 2013. — Vol. 319. — № 11. — P. 1663-1670.
73. Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression // *The Oncologist*. — 2004. — Vol. 9. — P. 10-17.
74. Vogel S., Peters C., Etmann N. et al. Migration of mesenchymal stem cells towards glioblastoma cells depends on hepatocyte-growth factor and is enhanced by aminolaevulinic acid-mediated photodynamic treatment // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2013. — Vol. 431. — № 3. — P. 428-432.
75. Vugas J.M., Tarleton A.E., Moizen K.B., Molzen K.B. Multicellular tumor spheroids formation by breast cancer cells isolated from different sites // *Cancer Research*. — 1978. — Vol. 38. — P. 2486-2491.
76. Ward J.P., King J. Mathematical modelling of avascular-tumour growth // *Mathematical Medicine and Biology*. — 1997. — Vol. 14. — № 1. — P. 39-69.
77. Wartenberg M., Gronczynska S., Bekhte M.M. et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species // *International Journal of Cancer*. — 2005. — Vol. 113. — P. 229-240.
78. Wartenberg M., Hoffmann E., Schwindt H. Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids // *FEBS Letters*. — 2005. — Vol. 579. — № 20. — P. 4541-4549.
79. Weng K.C., Hashizume R., Noble C.O. et al. Convection-enhanced delivery of targeted quantum dot-immunoliposome hybrid nanoparticles to intracranial brain tumor models // *Nanomedicine*. — 2013. — Vol. 8. — № 12. — P. 1913-1925.
80. West C.M., Moore J.V. Flow cytometric analysis of intracellular hematoporphyrin derivative in human tumour cells and multicellular spheroids // *Photochemistry and Photobiology*. — 1989. — Vol. 50. — № 5. — P. 665-669.
81. West C.M., Moore J.V. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: A flow cytometric study // *Photochemistry and Photobiology*. — 1992. — Vol. 55. — № 3. — P. 425-430.
82. Ying X., Wen H., Lu W.L. et al. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals // *Journal of Controlled Release*. — 2010. — Vol. 141. — № 2. — P. 183-192.
83. Yokoi K., Tanei T., Godin B. et al. Serum biomarkers for personalization of nanotherapeutics-based therapy in different tumor and organ microenvironments // *Cancer Letters*. — 2014. — Vol. 345. — № 1. — P. 48-55.
84. Yoshii Y., Waki A., Yoshida K. et al. The use of nanoimprinted scaffolds as 3D culture models to facilitate spontaneous tumor cell migration and well-regulated spheroid formation // *Biomaterials*. — 2011. — Vol. 32. — P. 6052-6058.
85. Zhu C., Sempkowski M., Holleran T. et al. Alpha-particle radiotherapy: For large solid tumors diffusion trumps targeting // *Biomaterials*. — 2017. Vol. 130. — P. 67-75.

*E.A. Prosekina, A.B. Danilova, T.L. Nehaeva,
I.A. Baldueva*

The creating of three-dimensional cellular models to solve theoretical and practical problems of modern oncology

N.N. Petrov Cancer Research Center of Oncology,
St. Petersburg

A tumor is a multicomponent, spatially difficult organized system, which is characterized by individual characteristics for each patient. In vitro cell model creating that is close in structure and properties to the natural tumor system will promote to solving such practical and theoretical problems of modern oncology as identifying the biological patterns of tumor growth, the behavior of cells of the immune system, testing potential antitumor drugs, determining the effectiveness of methods chemo-, radio-, photodynamic, targeted and immunotherapy. Such model can be three-dimensional cellular structures — spheroids (tumoroids). The review presents data about the features of three-dimensional cell modeling, the characteristics of existing 3D models and their application in experimental and clinical studies.

Key words: spheroids, tumoroids, solid tumors, 3D-cell modeling

Поступила в редакцию 25.07.2019 г.