

*А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева, Н.А. Ефремова, А.В. Новик, А.Ю. Зозуля, Г.И. Гафтон,
И.А. Балуева*

Оценка эффективности использования тумороидов для индивидуального подбора лекарственной терапии солидных опухолей

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

Подход к лечению злокачественных новообразований, направленный на определение эффективных терапевтических стратегий для каждого пациента, определяет необходимость разработки и использования модельных систем, которые воспроизводят структуру и биологию солидных опухолей человека. В трехмерных культурах сфероидов/тумороидов, представляющих из себя многоклеточные агрегаты малигнизированных клеток, можно создавать интересные межклеточные взаимодействия, градиенты питательных веществ и кислорода, а также клеточную полярность, которая отсутствует в традиционной двухмерной монослойной системе.

Данная работа посвящена сравнительному исследованию *in vitro* жизнеспособности и инвазивных свойств клеток солидных опухолей пациентов под действием химиопрепаратов и их комбинаций с целью оценки эффективности использования 3D-клеточной модельной системы в контексте трансляционной персонализированной медицины.

Основой для создания 3D-клеточных моделей служили культуры клеток солидных опухолей пациентов, которые проходили лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова в 2015–2021 гг. Фрагменты опухолевой ткани были получены интраоперационно: 1 — лейомиосаркома (ЛМС), 1 — рабдомиосаркома (РМС), 1 — синовиальная саркома (СС), 2 — миксофибросаркома (МФС), 2 — остеогенная саркома (ОС), 1 — меланома кожи (МК), 1 — рак молочной железы (РМЖ), (n=9).

Проведенный индивидуальный анализ сравнения эффективности воздействия химиотерапевтических препаратов *in vitro* на опухолевые клетки, имеющие различное происхождение и культивируемые в 2D и 3D-модельных системах, с реально наблюдаемой клинической ситуацией подтверждает, что монослойная культура как тест-система подходит в меньшей степени для подбора и индивидуализации лечения больных злокачественными новообразованиями: трехмерная

клеточная система оправдала себя в 77,7% случаев, а монослойная культура — в 44,4% случаев. Комбинация препаратов доксорубицин/ифосфамид и паклитаксел существенно ингибировали подвижность в матрикеле клеток сфероидов, но не влияли на жизнеспособность опухолевых клеток, что наблюдали во всех случаях, кроме ОС #921 и МК #929.

Культивирование опухолевых клеток в виде сфероидов/тумороидов позволяет использовать их как более адекватную доклиническую модель в качестве индивидуальной предиктивной тест-системы, позволяющей производить персонализированный подбор терапии.

Ключевые слова: злокачественные опухоли, сфероиды, тумороиды, химиорезистентность, доксорубицин, ифосфамид, паклитаксел

Прецизионная онкология — это подход к лечению злокачественных новообразований, который направлен на определение эффективных терапевтических стратегий для каждого пациента [1]. Разработка и использование модельных систем, которые воспроизводят структуру и биологию солидных опухолей человека, необходимы для лучшего понимания патофизиологии процессов, протекающих в опухоли, и разработки новых персонализированных противоопухолевых методов лечения. К сожалению, для многих типов неоплазий традиционные методики культивирования клеток не позволяют адекватно моделировать биологию нативной опухоли. Высокая частота неудач доклинических испытаний в клинических исследованиях ясно демонстрирует ограничения существующих доклинических моделей [2]. В то же время процесс разработки лекарств требует дальнейшего совершенствования в отношении скрининга противоопухолевых терапевтических средств, чтобы сделать этот процесс более экономически эффективным и исключить малоэффективные соединения на самой ранней стадии [3].

В настоящее время существует достаточное разнообразие клеточных систем, воспроизводящих микроокружение солидных опухолей [4]. В 3D-культурах сфероидов, представляющих собой многоклеточные агрегаты малигнизированных клеток, можно создавать интересующие межклеточные взаимодействия, градиенты питательных веществ и кислорода, а также клеточную поляриность, которая отсутствует в традиционной двухмерной монослойной системе [5, 6]. Сфероиды отражают гетерогенность опухолей и содержат зоны пролиферирующих, покоящихся и погибающих клеток, которые также присутствуют в малигнизированной ткани человека, и обладают разной чувствительностью к противоопухолевым препаратам [4, 7]. Кроме того, в стандартных 2D-моделях клетки всегда культивируют на поверхности с более высокой жесткостью (пластиковая чашка Петри — 105 кПа) по сравнению с более низкой жесткостью опухолевого микроокружения мягких тканей (1–25 кПа), что оказывает влияние на организацию компонентов цитоскелета, и, следовательно, на клеточную поляриность, метаболизм и экспрессию белков [8].

Миграция опухолевых клеток является ключевым признаком злокачественности, который ассоциирован с прогрессированием от первично локализованного опухолевого очага к инвазивному и/или метастатическому фенотипу. В традиционных методах оценки миграции опухолевых клеток *in vitro* обычно используют двухмерные гомогенные культуры, где не принимают во внимание гетерогенность опухоли, межклеточные контакты между малигнизированными клетками и клетками стромы опухоли, а также взаимодействия с белками внеклеточного матрикса [9]. Трехмерный анализ миграции на основе туморидов, который более точно отражает микросреду солидной опухоли, учитывая клеточные и внеклеточные взаимодействия, может быть использован для оценки эффективности воздействия лекарственных препаратов [10].

Таким образом, использование трехмерных моделей клеточных культур вносит значительный вклад в процесс открытия и разработки лекарственных средств, являясь важным промежуточным этапом между традиционными однослойными культурами *in vitro* и дорогостоящими исследованиями на животных *in vivo*, позволяющим минимизировать затраты на доклинические испытания. Кроме того, 3D-модели могут быть эффективным инструментом для оценки и выбора наиболее адекватной индивидуальной терапии для злокачественных новообразований определенных нозологий.

Мы представляем исследование *in vitro* жизнеспособности и инвазивных свойств клеток солидных опухолей, выделенных из интраопе-

рационного материала пациентов, проходивших лечение в ФБГУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, в 3D-системе под действием химиопрепаратов и их комбинаций, которые применялись для лечения этих больных, с целью оценки эффективности использования 3D-клеточной модельной системы в контексте трансляционной персонализированной медицины.

Материалы и методы

Основой для создания 3D-клеточных моделей служили культуры клеток солидных опухолей пациентов, которые проходили лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова в 2015–2021 гг. Фрагменты опухолевой ткани были получены интраоперационно: 1 — лейомиосаркома (ЛМС), 1 — рабдомиосаркома (РМС), 1 — синовиальная саркома (СС), 2 — миксофибросаркома (МФС), 2 — остеогенная саркома (ОС), 1 — меланома кожи (МК), 1 — рак молочной железы (РМЖ) (n=9). Протокол исследования был одобрен этическим комитетом, 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 г. Клиническая характеристика пациентов, гистологическая верификация опухолей и их локализация представлены в табл. 1.

Монослойные клеточные культуры. После механической дезагрегации тканевых образцов в Медимашине (Dako) клеточную суспензию пропускали последовательно через систему фильтров Filcon 70 и 50 мкм (BD Bioscience, США), после чего помещали в полную питательную среду DMEM/F12, содержащую 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (СЭКРС), глутамин (365 мг/л), инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селен (5 нг/мл) (Invitrogen, США), пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) (Sigma, США), и непрерывно культивировали при 5% CO₂, 100% влажности в пластиковых флаконах (BD Bioscience, США) по методу Freshney [11] с собственными модификациями [12]. После достижения монослоя клетки пересеивали, используя раствор, состоящий из равных долей 0,25% трипсина и 0,02% версена (Биолот, РФ). Культуры опухолевых клеток были получены во всех случаях, клетки культивировали непрерывно не менее 10 пассажей.

Опухолевые сфероиды. Для получения сфероидов применяли метод культивирования на низкоадгезивных поверхностях (Liquid overlay technique) с использованием 96-луночных планшетов Ultra-Low Attachment Surface (Corning, США). Клетки помещали в лунки планшета в посевной концентрации 1×10^5 в 200 мкл полной питательной среды. Сфероиды культивировали 3–8 сут в зависимости от клеточной линии в CO₂-инкубаторе «Heracel» (Thermo Electron LTD GmbH, ФРГ) при 37 °C, во влажной атмосфере с 5% уровнем CO₂. В процессе культивирования на 3–4 сут проводили смену среды в лунках планшета. По окончании культивирования изъятые сфероиды отмывали в фосфатно-солевом буфере, после чего проводили последующие манипуляции.

Химиопрепараты и их комбинации. Выбор химиотерапевтических агентов и их комбинаций для экспериментов *in vitro* был осуществлен в соответствии со схемой лечения пациентов, из образцов злокачественных новообразований которых были приготовлены культуры опухолевых клеток (см. табл. 1). В процессе терапии пациенты имели несколько линий химиотерапии с применением препаратов таксанового ряда, антрациклиновых антибиотиков, алкилирующих

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, из операционного материала которых были получены культуры опухолевых клеток для экспериментальных исследований

#	Пациент, пол, возраст, диагноз	Локализация образца	Лечение до получения опухолевого материала	Эффект лечения по системе RECIST	Лечение после получения опухолевого материала	Эффект лечения по системе RECIST	ОВ ¹ , мес.
728	П., м, 62 г., миксофибросаркома	Метастаз в мягкие ткани	1 линия: AD ²	SD ³	2 линия: Циклофосфан+Метотрексат в метрономном режиме в сочетании с ДКВ ⁴	SD	40,4
982	А., ж, 66 л., миксофибросаркома	Рецидив	1 линия: AI ⁵ 2 линия: GD ⁶	SD PD ⁷	Не проводилось		4,8
793	Р., ж, 42 г., злокачественная гигантоклеточная опухоль мягких тканей	Метастаз в легкое	1 линия: Дакарбазин+Доксорубицин+Циклофосфамид 2 линия: Цисплатин+Циклофосфамид+ Винкристин 3 линия: ТС ⁸ 4 линия: IE ⁹ 5 линия: GD	PD PD PD PD PD	6 линия: ДКВ	PD	4,9
921	Д., ж, 13 л., остеосаркома	Метастаз в легкое	1 линия: Доксорубицин+Цисплатин+Метотрексат 2 линия: ICE ¹⁰	SD PD	Не проводилось		1,3
716	М., ж, 48 л., синовиальная саркома	Рецидив	1 линия: AI 2 линия: ДКВ 3 линия: CyVADIC ¹²	PR ¹¹ PD SD	4 линия: Гемцитабин 5 линия: Пазопаниб	PD SD	10,6
699	М., ж, 28 л., лейомиосаркома	Метастаз в легкое	1 линия: GD 2 линия: AI	PD PR	3 линия: Трабектидин 4 линия: ДКВ 5 линия: Дакарбазин	PD PD PD	56
862	К., м, 12 л., рабдомиосаркома	Метастаз в легкое	1 линия: Винкристин+Ифосфамид+Этопозид+Карбоплатин+Эпирубицин 2 линия: Винкристин+ Топотекан +Циклофосфамид 3 линия: ICE 4 линия: ДКВ	SD PR SD PD	Не проводилось		2,7
929	С., ж, 29 л., меланома кожи	Метастаз в легкое	1 линия: Вемурафениб+Кобиметиниб+Ниволумаб 2 линия: ТС ¹² +Ипилимумаб	SD PD	Не проводилось		2,0
973	К., ж., 40 л., трижды негативный рак молочной железы	Первичная опухоль	1 линия: AC ¹³ 2 линия: ТС 3 линия: Эрибулин+Капецитабин	PD PD PD	Не проводилось		2,0

Примечания. ¹ Общая выживаемость (ОВ) от даты получения опухолевого материала до смерти; ² химиотерапия по схеме Доксорубицин+Дакарбазин (AD); ³ Stable Disease (SD); ⁴ дендритно-клеточная вакцина (ДКВ); ⁵ химиотерапия по схеме Доксорубицин+Ифосфамид (AI); ⁶ химиотерапия по схеме Гемцитабин+Доцетаксел (GD); ⁷ Progressive Disease (PD); ⁸ химиотерапия по схеме Паклитаксел+Карбоплатин (ТС); ⁹ химиотерапия по схеме Ифосфамид+Этопозид (IE); ¹⁰ Ифосфамид+Карбоплатин+Этопозид (ICE); ¹¹ Partial Response (PR); ¹² химиотерапия по схеме Циклофосфан, Винкристин, Адриамицин (CyVADIC); ¹³ химиотерапия по схеме Доксорубицин+Циклофосфамид (AC).

Таблица 2. Фармакокинетические характеристики исследуемых химиопрепаратов

Название препарата	Пик концентрации препарата в плазме крови, мкг/мл	10% от пика 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

средств: паклитаксел, цисплатин, доксорубин, ифосфамид. В системе *in vitro* были использованы концентрации этих препаратов в соответствии с их фармакокинетическими свойствами: паклитаксел (Новалек Фармасьютикалс, Индия) (пик концентрации в плазме крови (ПК) — 2,17 мкг/мл; 10%ПК — 0,217 мкг/мл), цисплатин (Цисплатин-Тева, Израиль) (ПК — 3 мкг/мл, 10%ПК — 0,3 мкг/мл), комбинация доксорубин (Лэнс-фарм, Россия)+ифосфамид (Холоксан, Бакстер онкология гмбх, Германия) (ПК — 1,0/440 мкг/мл; 10%ПК — 0,1/44 мкг/мл) в соответствии со схемой химиотерапии А1. Для расчета действующей концентрации препарата использовали информацию о пике его концентрации в плазме крови согласно указаниям Salmon S.E. и соавт. (1980) [13]. В данном руководстве рекомендовано принимать *in vitro* в качестве эквивалента терапевтической дозы концентрацию, равную 10% от пика концентрации препарата в плазме крови. Время инкубации в условиях CO₂-инкубатора (+37 °С, 5–6,5% CO₂) с химиопрепаратом соответствовало времени его полувыведения из организма человека (табл. 2).

Определение жизнеспособности опухолевых клеток. Для оценки химиорезистентности и жизнеспособности опухолевых клеток был использован МТТ-тест. МТТ-тест обнаруживает NAD(P)H-зависимую клеточную оксидоредуктазную активность, которая ассоциирована с жизнеспособностью клеток. Этот фермент восстанавливает тетразолиевый краситель МТТ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид до нерастворимого формазана. Сфероиды и монослойные культуры помещали в 96-луночные планшеты и инкубировали с химиопрепаратами. Затем в лунки вносили по 10 мкл метаболита МТТ (Roche, Швейцария) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали в течение 4 ч (для монослойных культур) и в течение 24 ч (для опухолевых) в условиях CO₂-инкубатора. Далее добавляли 100 мкл диметилсульфоксида (DMSO) и инкубировали дополнительно в течение часа. Для опухолевых содержимое лунок переносили в эппендорфы, центрифугировали, удаляли супернатанты и добавляли 100 мкл DMSO. Затем раствор снова переносили в 96-луночный планшет.

Оптическую плотность (ОП) полученных растворов измеряли на фотометре для микропланшет iMark (Bio-Rad

Laboratories, США) при длине волны 595 нм. Для перевода единиц оптической плотности (Е) в проценты жизнеспособности использовали формулу: $(E_{\text{опыт}} - E_{\text{контроль}}) \times 100\%$.

Оценка инвазивного потенциала опухолевых клеток. Исследование инвазивных свойств опухолевых клеток осуществляли в трехмерной среде — матригеле (Corning, США) под влиянием цитостатиков с помощью автоматической аналитической системы наблюдения за живыми клетками Cell-IQ (CM Technologies Oy, Финляндия). Опухолевые сфероиды отмывали фосфатно-солевым буфером, после чего высаживали в ячейки 48-луночного планшета, предварительно покрытого полимеризованным матригелем, с добавлением 700 мкл полной питательной среды, содержащей исследуемые химиопрепараты в соответствующих концентрациях.

Анализ изменения диаметра и площади опухолевых клеток осуществляли с помощью программного обеспечения Cell-IQ® Analyser™ (CM Technologies Oy, Финляндия), которое автоматизирует процесс количественного измерения нескольких параметров клеток на основе фазового контраста. Инвазивный потенциал опухолевых клеток в 3D-системе оценивали по изменению площади, занимаемой сфероидом.

Статистическая обработка. Проводили статистическую обработку данных с использованием W-критерия 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) и с помощью R v. 4.0.1. [14].

Результаты

После дезагрегации опухолевых фрагментов были получены культуры ЛМС #699, РМС #862, СС #716, МФС #728, #982, ОС #793, #921, МК #929, РМЖ #973. Морфологически все выделенные опухолевые клетки, культивируемые в виде монослоя, отличались высокой гетерогенностью, в том числе в пределах одного гистологического типа, и формировали сфероиды (рис. 1).

Таблица 3. Результаты сравнительного анализа эффективности воздействия химиотерапевтических агентов на жизнеспособность и инвазивные свойства клеток солидных опухолей, культивируемых в 2D и 3D-системах

Клетки	Жизнеспособность (% по отношению к контролю)								Инвазия (скорость изменения площади сфероида, (мкм ² /ч)×10 ³)				
	А1				Паклитаксел				А1		Паклитаксел		Контроль
	ПК		10%ПК		ПК		10%ПК		ПК	10%ПК	ПК	10%ПК	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D					
МФС #728	27,1	79,0	34,2	81,8	93,0	92,1	90,7	85,6	0,5	6,06	0,85	1,23	7,54
МФС #982	59,6	82,5	75,6	83,2	79,2	73,1	79,8	98,9	3,6	4,97	2,76	3,26	9,16
РМС #862	26,2	84,2	30,3	86,9	92,3	97,6	92,4	98,8	3,58	4,53	2,69	3,87	6,39
ЛМС #699	–	–	–	–	54,1	106,3	66,0	101,9	–	–	0,41	0,35	11,8
СС #716	80,5	99,3	99,4	94,8	91,7	92,2	99,1	86,7	1,03	8,75	3,5	7,44	12,7
ОС #793	49,8	102,0	60,9	98,0	66,2	94,6	94,9	104,0	1,51	1,21	1,78	2,07	7,49
ОС #921	88,1	88,9	82,5	90,0	92,5	90,0	89,7	89,1	11,02	12,7	10,79	10,79	13,09
РМЖ #973	–	58,1	–	79,3	–	64,4	–	79,5	1,3	4,69	1,49	1,74	7,64
	Цисплатин				Паклитаксел				Цисплатин		Паклитаксел		Контроль
	ПК		10%ПК		ПК		10%ПК		ПК	10%ПК	ПК	10%ПК	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D					
	МК #929	92,6	89,6	86,0	90,6	137,0	123,4	98,7	108,3	13,25	13,54	9,12	9,51

Примечания. А1 — доксорубин+ифосфамид; ПК — пик концентрации препарата в плазме крови, мкг/мл; 10%ПК — 10% от пика концентрации препарата в плазме крови, мкг/мл; МФС — миксофибросаркома; РМС — рабдомиосаркома; ЛМС — лейомиосаркома; СС — синовиальная саркома; ОС — остеосаркома; РМЖ — рак молочной железы; МК — меланома кожи.

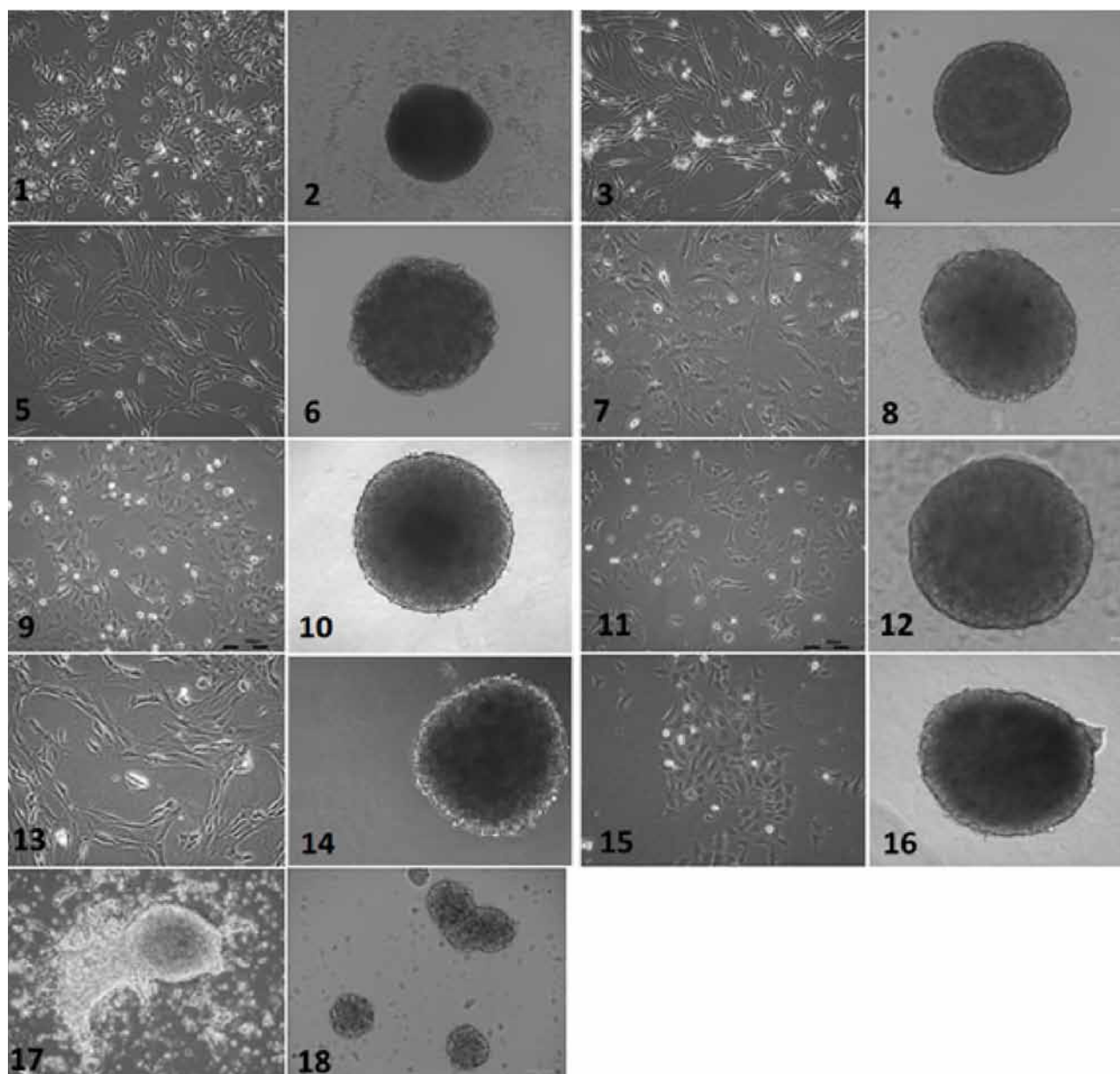


Рис. 1. Монослойные культуры и сфероиды, полученные из фрагментов солидных опухолей пациентов.
 1, 2 — культура клеток синовиальной саркомы #716; 3, 4 — культура клеток лейомиосаркомы #699;
 5, 6 — культура клеток рабдомиосаркомы #862; 7, 8 — культура клеток миксофибросаркомы #728; 9, 10 — культура клеток миксофибросаркомы #982; 11, 12 — культура клеток остеосаркомы #921; 13, 14 — культура клеток остеосаркомы #793;
 15, 16 — культура клеток меланомы кожи #929; 17, 18 — культура клеток рака молочной железы #973.
 Инвертированный микроскоп, фазовый контраст. Масштабная линейка для монослойных культур — 200 мкм, для сфероидов — 100 мкм

Были изучены жизнеспособность и инвазивные свойства клеток солидных опухолей в 2D- и 3D-системе под действием химиопрепаратов и их комбинаций, применяемых для лечения пациентов. Так как число наблюдений было невелико, использовали индивидуальный анализ каждой культуры. Во всех случаях клетки, культивируемые в виде 2D-монослоя, были менее резистентны к воздействию химиотерапевтических агентов по сравнению с клетками в опухолях (табл. 3). Комбинация препаратов доксорубин+ифосфамид (AI) и паклитаксел существенно ингибировали подвижность в

матригеле клеток сфероидов, за исключением остеосаркомы #921 и меланомы #929, на которые препараты практически не оказали воздействия.

Индивидуальный анализ продемонстрировал, что поведение опухолевых клеток, культивируемых в трехмерных системах, воспроизводит реальную клиническую ситуацию, наблюдаемую при терапии пациентов. При этом в 5 случаях из 9 опухолевые клетки, культивируемые в 3D-формате, сохраняли жизнеспособность, но их инвазивные свойства подвергались существенным изменениям.

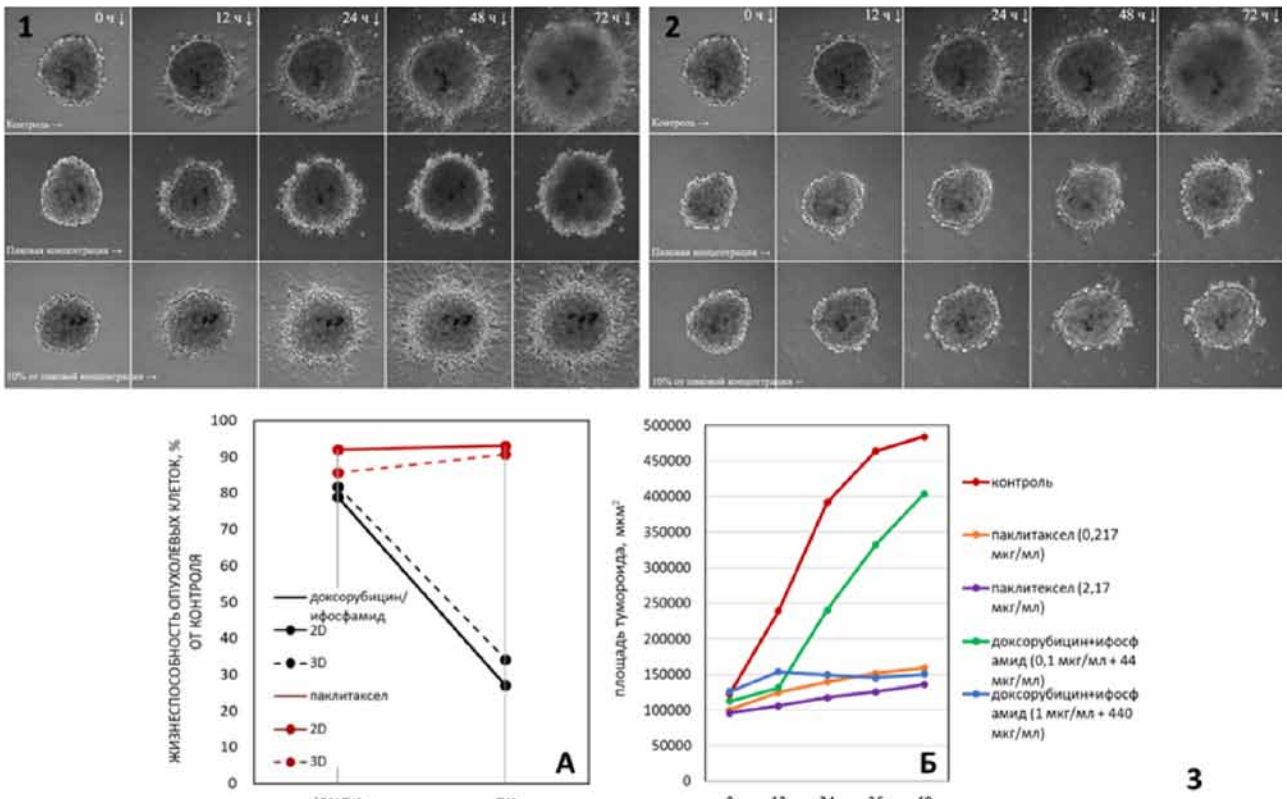


Рис. 2. Воздействие химиопрепаратов на культуру МФС #728, 44 пассаж. 1 — изменение площади сфероидов под воздействием комбинации доксорубин/ифосфамид; 2 — изменение площади сфероидов под воздействием паклитаксела; 3, А — влияние препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток в 2D и 3D-системах, Б — цифровое выражение влияния препаратов на инвазию опухолевых клеток. По оси абсцисс — время наблюдения, ч. Общее время наблюдения 72 ч. Фазовый контраст. Ув. 100

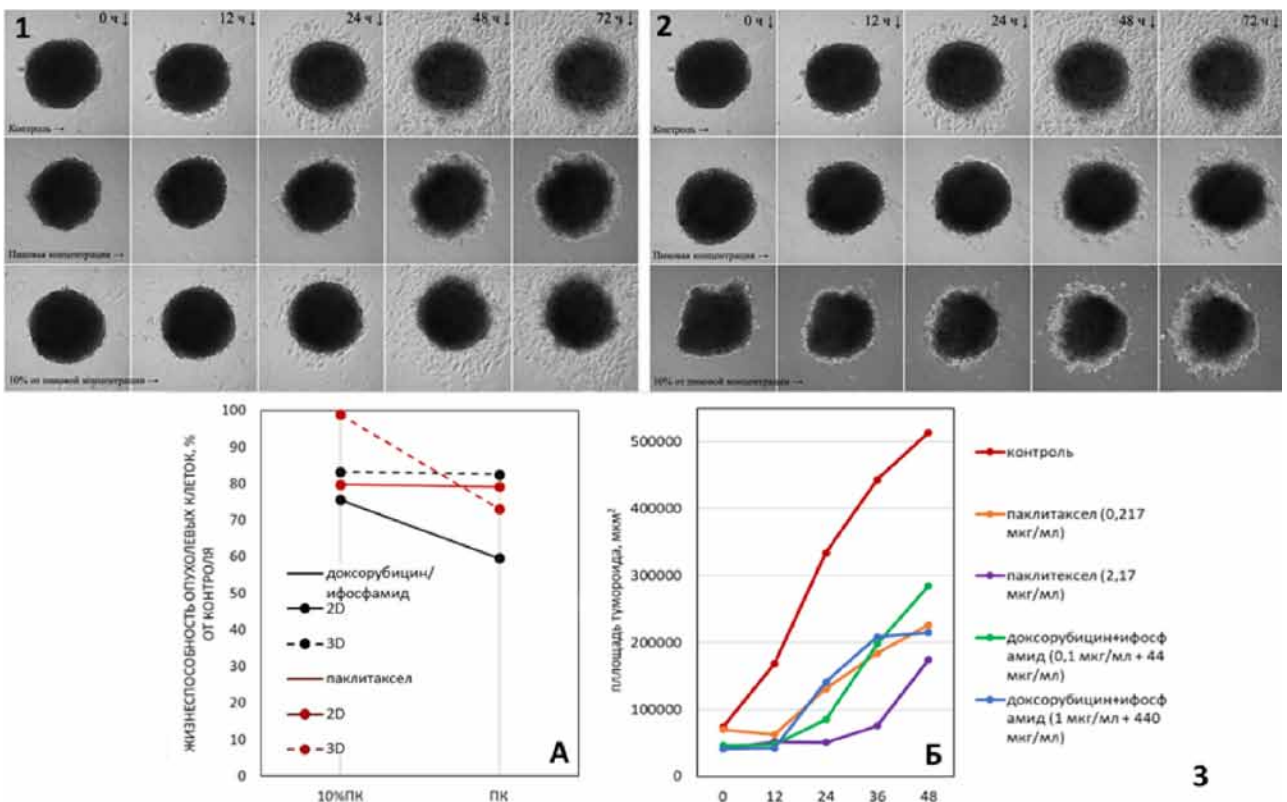


Рис. 3. Воздействие химиопрепаратов на культуру МФС #982, 34 пассаж. 1 — изменение площади сфероидов под воздействием комбинации доксорубин/ифосфамид; 2 — изменение площади сфероидов под воздействием паклитаксела; 3, А — влияние препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток в 2D и 3D-системах, Б — цифровое выражение влияния препаратов на инвазию опухолевых клеток. По оси абсцисс — время наблюдения, ч. Общее время наблюдения 72 ч. Фазовый контраст. Ув. 100

Так, клетки МФС #728 и #982 демонстрировали высокий инвазивный потенциал, скорость изменения площади сфероидов составила 7,54 и 9,16 (мкм²/ч)×10³ соответственно (см. табл. 3). Воздействие комбинации А1 или паклитаксела оказало ингибирующее действие на подвижность опухолевых клеток: скорость распространения сфероидов в матрикеле при концентрации препаратов 10% ПК составила 6,06 и 4,97; 1,23 и 3,26 (мкм²/ч)×10³ соответственно (рис. 2, 3). При этом клетки МФС сохраняли в значительной степени жизнеспособность в сфероидах, в то время как процент живых клеток по отношению к контролю был существенно ниже в монослойных культурах: 2D/3D — 34,2/81,8% и 75,6/83,2% при воздействии 10% ПК комбинации доксорубицин/ифосфамид, и в случае 10%ПК паклитаксела для культуры #982 — 79,8/98,9%, в то же время клетки культуры #728 сохраняли резистентность к этому препарату в обоих случаях. Таким образом, под влиянием паклитаксела, и, в меньшей степени, комбинации препаратов А1, клетки миксофибросарком #728 и #982 в системе 3D сохраняли жизнеспособность, но частично теряли инвазивные свойства. Наблюдаемая картина коррелировала с клинической картиной заболевания пациентов, у которых на фоне данной терапии наблюдали непродолжительное время стабилизацию заболевания: время до прогрессирования от момента забора опухолевого материала для приготовления клеточной культуры составило 7,2 и 3,3 мес. соответственно (см. табл. 1).

Сходную картину выявили при изучении поведения клеток ЛМС #699 в 2D- и 3D-системах культивирования под воздействием паклитаксела, который был использован для терапии пациента М. Клетки ЛМС в сфероидах сохраняли жизнеспособность, но теряли подвижность под влиянием паклитаксела. На фоне терапии ЛМС пищевода комбинацией гемцитабин+доцетаксел у данного больного наблюдали частичный регресс и, далее, разнонаправленную динамику опухолевых очагов.

При культивировании клеток РМС #862 паклитаксел почти не влиял на жизнеспособность опухолевых клеток: в присутствии 10% ПК паклитаксела жизнеспособность образцов монослойных культур составила 92,4%, сфероидов — 98,8%. Была обнаружена химиочувствительность опухолевых клеток к комбинации А1: при добавлении 10%ПК данных препаратов наблюдали уменьшение жизнеспособности малигнизированных клеток в опухолях до 86,9% от контроля.

Тумороиды #862 в условиях без воздействия изучаемых химиопрепаратов проявляли значительный инвазивный потенциал: занимаемая площадь опухоля за 48 ч наблюдения увеличивалась почти в 8 раз: с 44×10³ мкм² до

351×10³ мкм² (рис. 4). Инвазивные свойства опухолевых клеток этой культуры были блокированы при культивировании с паклитакселом: при дозе ПК площадь сфероидов увеличивалась с 42×10³ мкм² только до 172×10³ мкм², при культивировании с комбинацией А1 — с 44×10³ мкм² до 216×10³ мкм². Данный эффект наблюдали также при дозе 10%ПК. Феномен уменьшения жизнеспособности опухолевых клеток и угнетения их способности к инвазии соотносится с клиническими результатами лечения пациента К, когда на фоне трех линий химиотерапии с включением в схему лечения препаратов эпирубицин, паклитаксел и ифосфамид наблюдали частичный регресс опухолевого очага.

Из операционного материала пациента М. с СС, который получил курс комбинированной химиотерапии, включающей схему А1, была получена культура #716. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что клетки СС в монослое и сфероидах оказались практически не чувствительными к действию химиопрепаратов: при добавлении паклитаксела жизнеспособность снижалась не более чем на 5%, а при добавлении А1 не снижалась. В контроле при культивировании в матрикеле наблюдали высокую скорость инвазии: через 48 ч площадь, занимаемая опухолюмом, увеличилась в 12,6 раз: с 52,3×10³ мкм² до 660×10³ мкм² (рис. 5). Минимальное изменение площади сфероидов было отмечено при культивировании в среде с ПК комбинации А1: от 40×10³ мкм² до 89,1×10³ мкм² и при добавлении 10% ПК той же комбинации химиопрепаратов: с 63,7×10³ мкм² до 483×10³ мкм². Эффект угнетения инвазивных свойств наблюдали и при добавлении обеих концентраций паклитаксела: за 48 ч площадь опухоля увеличивалась с 59×10³ мкм² до 228×10³ мкм² и с 59×10³ мкм² до 416×10³ мкм², соответственно. Картина, наблюдаемая *in vitro*, в данном случае коррелирует с ответом на лечение — частичным регрессом злокачественного новообразования.

Снижение жизнеспособности опухолевых клеток почти в два раза под влиянием комбинации А1 и паклитаксела в монослойных культурах и отсутствие эффекта в сфероидах наблюдали в случае ОС #793 (рис. 6). При этом происходило ингибирование инвазивных свойств клеток данной культуры. Скорость распространения сфероидов в матрикеле уменьшилась с 7,49 до 1,21 и 2,07 (мкм²/ч)×10³ при воздействии 10% ПК А1 и паклитаксела, соответственно. Клинически у больной Р. отмечали непрерывное прогрессирование опухолевого процесса на фоне проводимого лечения при использовании схем химиотерапии дакарбазин+доксирубицин+циклофосфамид, цисплатин+циклофосфамид+винкристин, синдаксел+карбоплатин, ифосфамид+этопозид, гемцитабин+доцетаксел.

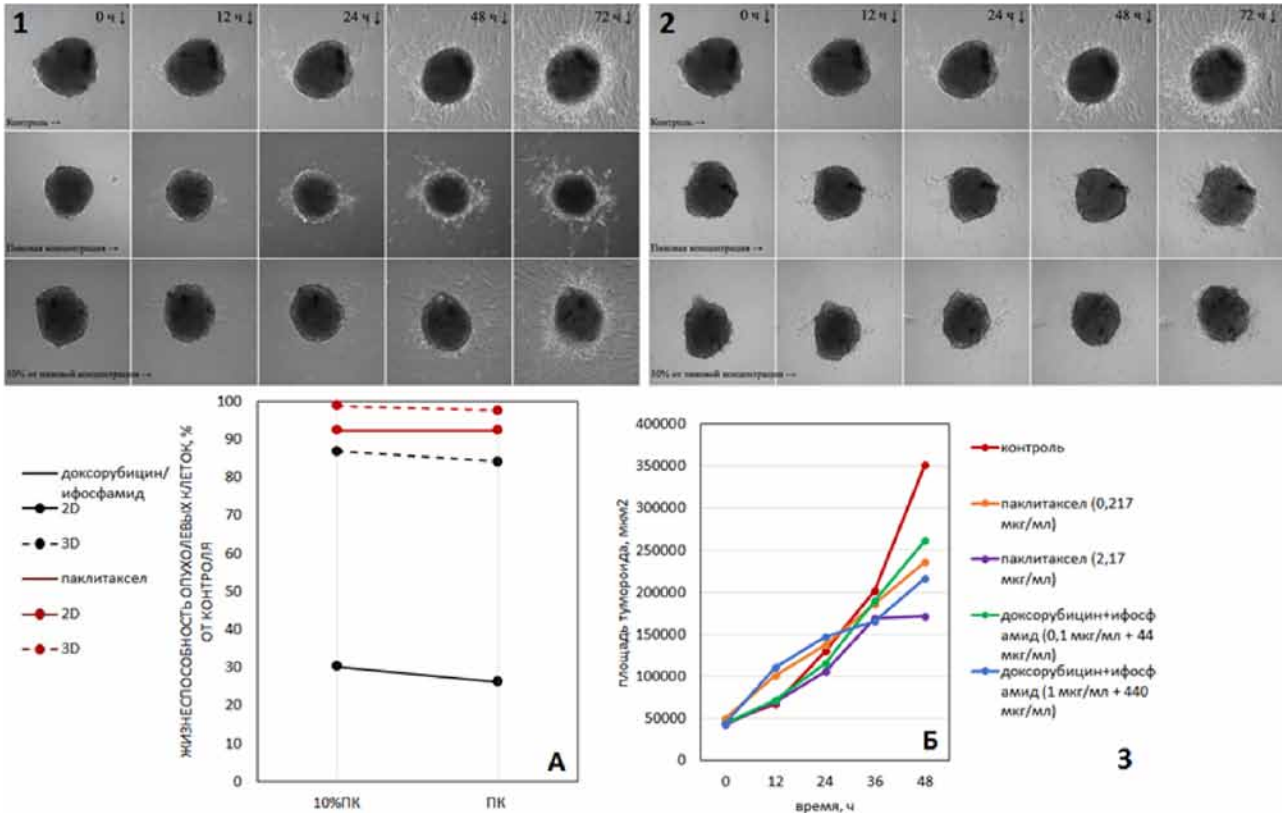


Рис. 4. Воздействие химиопрепаратов на культуру PMS #862, 45 пассаж. 1 — изменение площади сфероидов под воздействием комбинации доксорубицин/ифосфамид; 2 — изменение площади сфероидов под воздействием паклитаксела; 3, А — влияние препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток в 2D и 3D-системах, Б — цифровое выражение влияния препаратов на инвазию опухолевых клеток. По оси абсцисс — время наблюдения, ч. Общее время наблюдения 72 ч. Фазовый контраст. Ув. 100

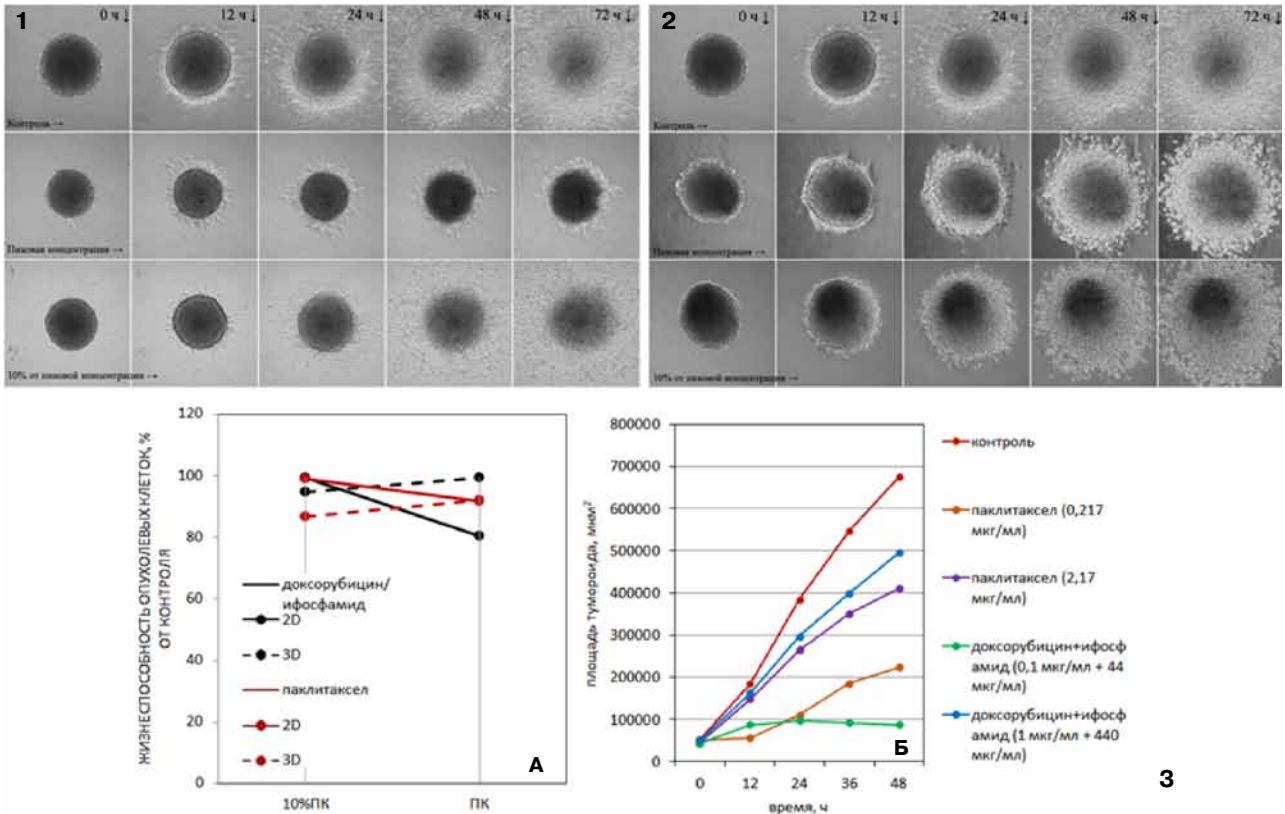


Рис. 5. Воздействие химиопрепаратов на культуру CS #716, 27 пассаж. 1 — изменение площади сфероидов под воздействием комбинации доксорубицин/ифосфамид; 2 — изменение площади сфероидов под воздействием паклитаксела; 3, А — влияние препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток в 2D и 3D-системах, Б — цифровое выражение влияния препаратов на инвазию опухолевых клеток. По оси абсцисс — время наблюдения, ч. Общее время наблюдения 72 ч. Фазовый контраст. Ув. 100

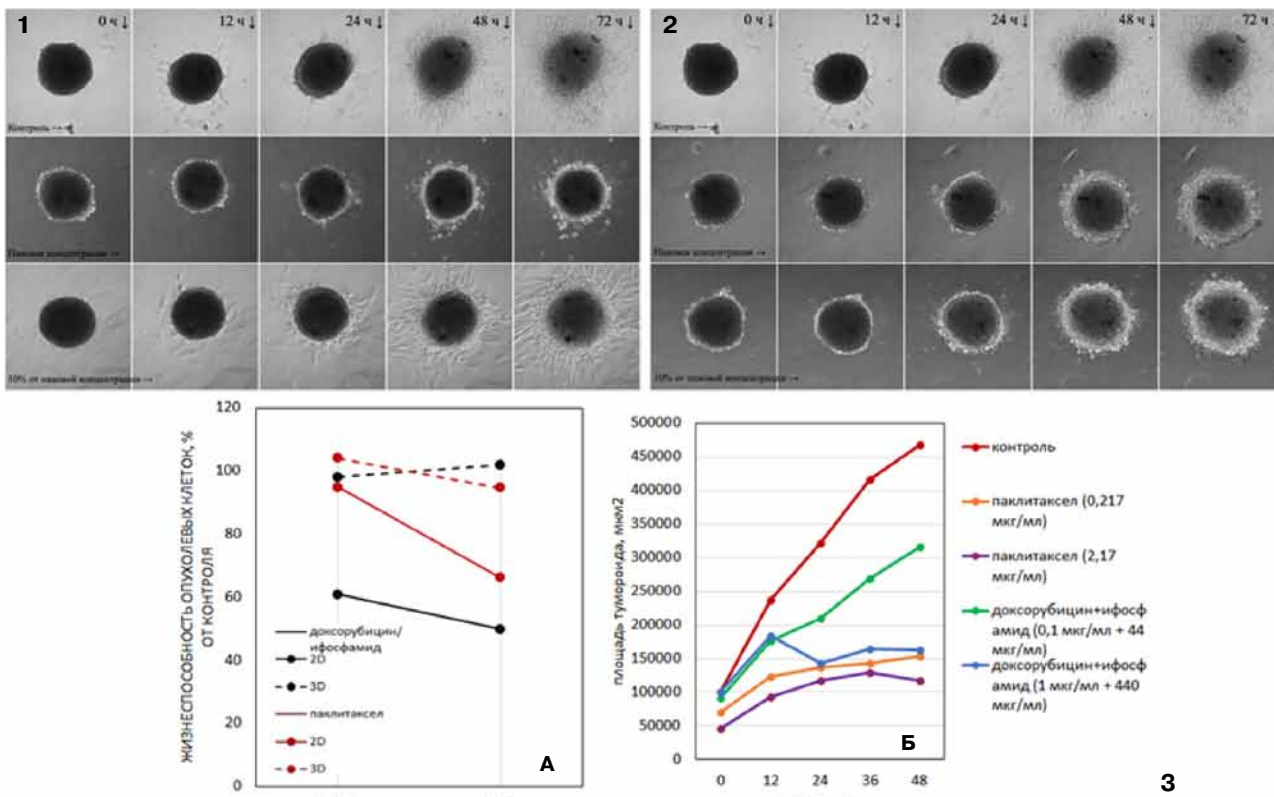


Рис. 6. Воздействие химиопрепаратов на культуру СС #793, 36 пассаж.

1 — изменение площади сфероида под воздействием комбинации доксорубицин/ифосфамид; 2 — изменение площади сфероида под воздействием паклитаксела; 3, А — влияние препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток в 2D и 3D-системах, 3, Б — цифровое выражение влияния препаратов на инвазию опухолевых клеток. По оси абсцисс — время наблюдения, ч. Общее время наблюдения 72 ч. Фазовый контраст. Ув. 100

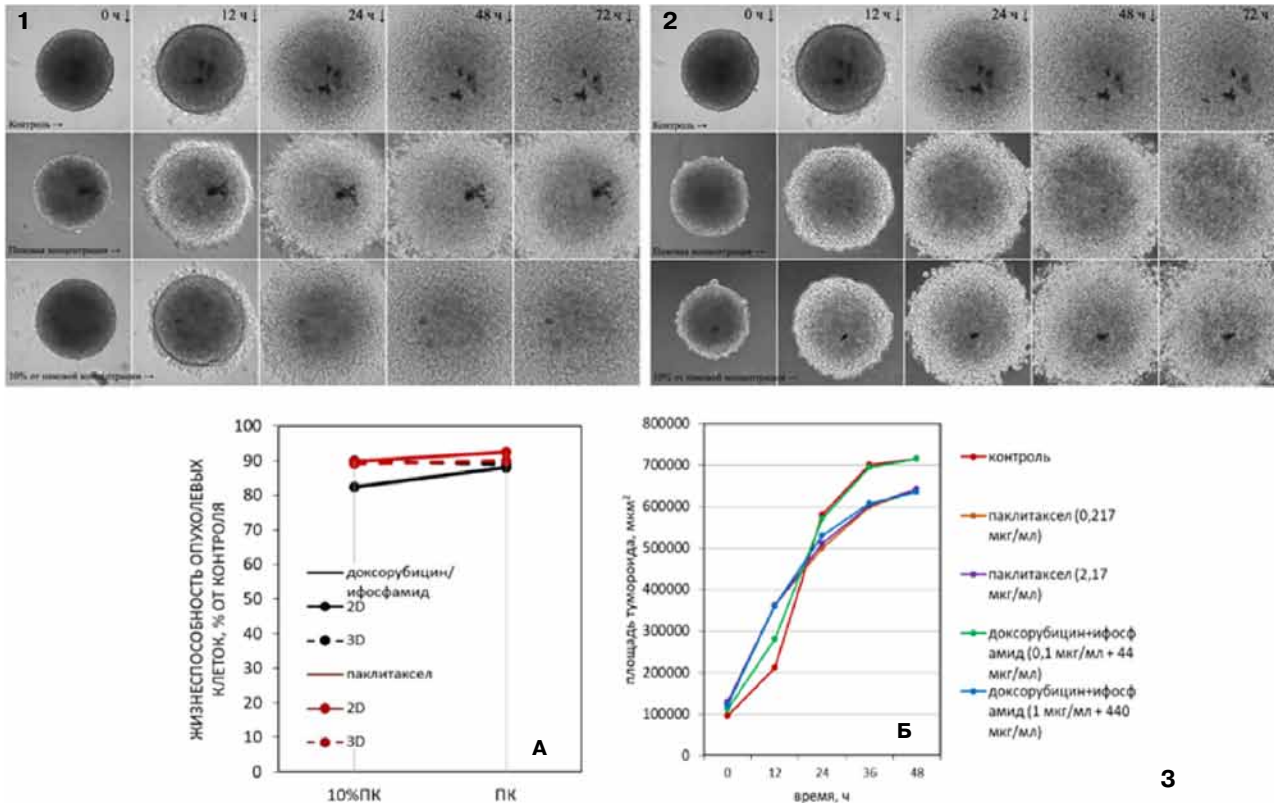


Рис. 7. Воздействие химиопрепаратов на культуру СС #921, 10 пассаж.

1 — изменение площади сфероида под воздействием комбинации доксорубицин/ифосфамид; 2 — изменение площади сфероида под воздействием паклитаксела; 3, А — влияние препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток в 2D и 3D-системах, 3, Б — цифровое выражение влияния препаратов на инвазию опухолевых клеток. По оси абсцисс — время наблюдения, ч. Общее время наблюдения 72 ч. Фазовый контраст. Ув. 100

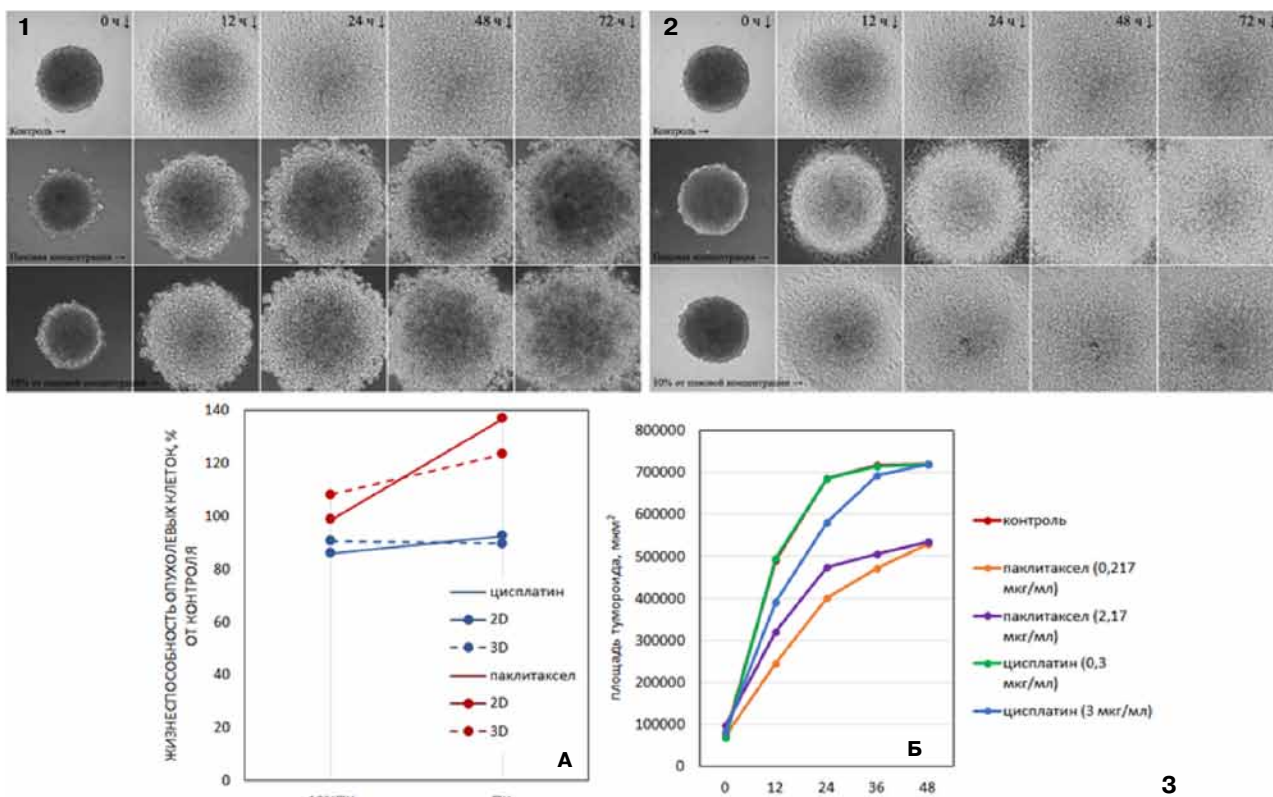


Рис. 8. Воздействие химиопрепаратов на культуру МК #929, 56 пассаж. 1 — изменение площади сфероида под воздействием цисплатина; 2 — изменение площади сфероида под воздействием паклитаксела; 3, А — влияние препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток в 2D и 3D-системах, 3, Б — цифровое выражение влияния препаратов на инвазию опухолевых клеток. По оси абсцисс — время наблюдения, ч. Общее время наблюдения 72 ч. Фазовый контраст. Ув. 100

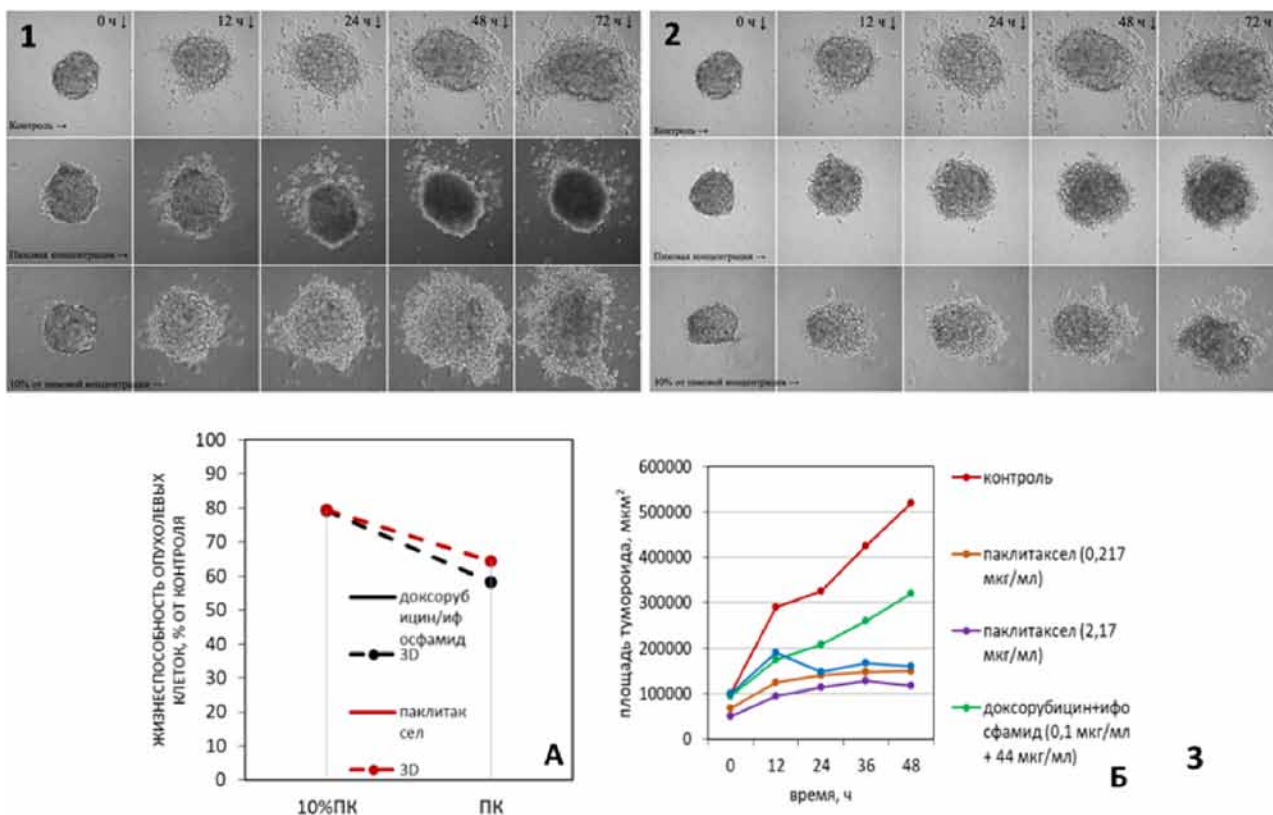


Рис. 9. Воздействие химиопрепаратов на культуру РМЖ #973, 27 пассаж. 1 — изменение площади сфероида под воздействием цисплатина; 2 — изменение площади сфероида под воздействием паклитаксела; 3, А — влияние препаратов на жизнеспособность опухолевых клеток в 3D-системе, 3, Б — цифровое выражение влияния препаратов на инвазию опухолевых клеток. По оси абсцисс — время наблюдения, ч. Общее время наблюдения 72 ч. Фазовый контраст. Ув. 100

Для культуры ОС #921 МТТ-тест продемонстрировал, что незначительную чувствительность к ПК и 10%ПК комбинации А1 проявляют монослойные культуры, тогда как тумороиды оказались нечувствительны к данной комбинации препаратов в этих концентрациях. Отсутствие цитотоксического эффекта наблюдали также при действии паклитаксела (рис. 7).

В контроле сфероиды #921 демонстрировали высокую скорость распространения в матрикеле: через 48 ч площадь, занимаемая тумороидом, увеличилась в 7,9 раза: с 91×10^3 мкм² до 719×10^3 мкм². При этом имело место отсутствие ответа на комбинацию А1 и паклитаксел в обеих концентрациях. Инвазивные свойства малигнизированных клеток под воздействием химиопрепаратов не отличались от свойств контрольной группы. Через 48 ч опухолевые сфероиды занимали всё поле зрения микроскопа, их площадь увеличивалась в 7 раз по сравнению с исходной. Таким образом, данная культура продемонстрировала резистентность высокой степени к воздействию исследуемых химиотерапевтических агентов. Клинически у больной Д. отмечали кратковременную стабилизацию опухолевого процесса на фоне терапии комбинацией доксорубицин+цисплатин+метотрексат. В дальнейшем — прогрессирование на фоне терапии комбинацией ифосфамид+карбоплатин+этопозид.

Для лечения пациента С. с МК применяли BRAF- и MEK-ингибиторы, ниволумаб, комбинацию паклитаксел+карбоплатин и на фоне лечения наблюдали быстрое прогрессирование заболевания. В рамках нашего исследования культура МК #929, полученная из биологического материала этого больного, была использована как пример опухоли с высокой резистентностью к химиотерапии. Ко всем подобранным комбинациям химиопрепаратов наблюдали *in vitro* отсутствие ответа малигнизированных клеток, составляющих сфероид (рис. 8). Более того, в присутствии паклитаксела происходила стимуляция пролиферации опухолевых клеток: при ПК и 10%ПК процент жизнеспособных клеток по отношению к контролю в тумороидах и монослое составил 123,4 и 137%, 108,3 и 98% соответственно. Не наблюдали изменения инвазивных свойств опухолевых клеток под действием изучаемых химиотерапевтических агентов. В данном случае имела место четкая корреляция отсутствия клинического эффекта на фоне лечения и поведением сфероидов *in vitro*.

Культура клеток РМЖ #793 была получена из первичной опухоли, при этом заболевание имело крайне агрессивное течение. *In vitro* данная культура имела полусуспензионный характер роста со склонностью к спонтанному образованию сфероидов, клетки которых обладали чув-

ствительностью к обеим концентрациям паклитаксела и комбинации А1: наблюдали снижение жизнеспособности опухолевых клеток до 58,1 и 79,3%, 64,4 и 79,5% соответственно (рис. 9).

В контроле при культивировании в матрикеле имел место высокий инвазивный потенциал: через 48 ч площадь, занимаемая опухолевым сфероидом, увеличилась в 4,7 раза: с 100×10^3 мкм² до 467×10^3 мкм² (см. рис. 9). Наблюдали эффект угнетения скорости распространения сфероида при добавлении в среду 10%ПК комбинации А1 — 4,69 против 7,64 (мкм²/ч) $\times 10^3$ в контроле. Процесс ингибирования инвазивных свойств тумороидов обнаруживался при культивировании в среде с 10%ПК паклитаксела, в этом случае максимальная площадь сфероида составила 153×10^3 мкм². В этом эксперименте химиопрепараты в дозах, соответствующих терапевтическим, *in vitro* ингибировали пролиферативную активность и инвазивный потенциал клеток РМЖ #973. В то же время клинически наблюдали выраженное прогрессирование опухолевого процесса непосредственно на фоне проводимой химиотерапии: 1 линия АС (доксорубицин+циклофосфамид); 2 линия ТР (доцетаксел+карбоплатин); 3 линия — эрибулин+капецитабин.

Обсуждение

Химиотерапия, по-прежнему, остается важным методом лечения различных злокачественных новообразований, особенно их метастатических форм. Однако до сих пор нет значительного прогресса в результатах лечения онкологических больных, хотя за последние 50 лет было введено в клиническое использование большое количество химиотерапевтических препаратов. Поскольку злокачественные новообразования представляют собой группу гетерогенных заболеваний, реакция на один и тот же химиотерапевтический агент может быть различна даже у пациентов с опухолями одного гистологического фенотипа, что делает необходимым индивидуальный подход к терапии. Этот подход основан на функциональной биологии опухоли и известен как анализ химиочувствительности опухоли [15]. Для достижения этой цели важно разрабатывать более сложные клеточные модели, которые лучше имитируют физиологические ткани в контексте микроокружения опухоли. Это может быть достигнуто с помощью методов трехмерного культивирования клеток [16].

Недостатком скрининга лекарственных средств с использованием монослойных клеточных моделей является часто наблюдаемое отсутствие корреляции между результатами, полученными в экспериментальных условиях,

и реальными клиническими результатами лечения. Полученные нами опухолюиды являются патофизиологически значимыми доклиническими моделями для исследования инвазивных фенотипов опухолей.

В настоящее время опухолевые клеточные трехмерные модели *in vitro* начали активно применять для прогностической оценки противоопухолевых методов лечения, таких как химиотерапия, радиотерапия, фотодинамическая терапия, генная терапия и иммунотерапия.

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 *in vitro* для исследований цитотоксичности противоопухолевых препаратов, патофизиологических градиентов и процессов их диффузии. В частности, S.L'Espérance и соавт. (2008) исследовали химиорезистентность с помощью сфероидов, полученных из шести клеточных линий рака яичника, обработанных 10,0 мкМ цисплатина, 2,5 мкМ паклитаксела или 5,0 мкМ топотекана в течение 72 ч [17]. Они провели профилирование экспрессии ряда генов, связанных с ростом и пролиферацией клеток, со сборкой и организацией цитоскелета, с гибелью клеток, 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 (*BRCA1*, *BRCA2*, *DDB2*, *FANCA*). При этом подобную сверхэкспрессию генов не наблюдали в монослойных культурах. Согласно мнению многих исследователей сфероиды оказались особенно ценной моделью в исследовании ответа опухолевых клеток на химиотерапию и радиотерапию [18].

T. Puls и соавт. (2018) разработали трёхмерные модели рака поджелудочной железы в совокупности с опухолеассоциированными фибробластами и исследовали инвазивный потенциал клеток в матрикеле при добавлении в среду гемцитабина [19]. Авторам удалось

найти эффективную дозу, при которой клетки из опухолевого сфероиды не проникали в окружающий его матрикель, а также показать, что гемцитабин не индуцировал гибель опухолевых клеток, а лишь изменял их инвазивные характеристики и ингибировал пролиферацию. В представленном нами исследовании были получены аналогичные результаты при изучении химиочувствительности сфероидов другого происхождения (СМТ/ОС, РМЖ). С помощью МТТ-теста при определении чувствительности опухолюидов и монослойных культур к химиопрепаратам и их комбинациям, которые были использованы в лечении пациентов в клинике, было обнаружено, 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 или погибают в незначительном количестве. Это было характерно для культур МСФ, РМС, ЛМС, СС, ОС #793, РМЖ, но не ОС #921 и МК.

В большинстве случаев мы установили взаимосвязь между клинической эффективностью лекарственной терапии опухолевого заболевания (прогрессирование, стабилизация заболевания, частичный регресс) и эффектом химиотерапевтических агентов *in vitro*, что позволяет считать опухолюиды адекватной предиктивной моделью, дающей возможность индивидуализировать лечебный процесс. В нашем ретроспективном исследовании трехмерная клеточная система оправдала себя в 7 из 9 случаев. При этом интересно отметить, что практически все культуры опухолевых клеток были получены из метастазов, сформировавшихся в результате прогрессирования процесса после проведенного лечения, поэтому расхождение клинических наблюдаемых результатов (кратковременная стабилизация заболевания на фоне проводимой терапии) и экспериментальных результатов *in vitro*, когда клетки оказались резистентны к выбранным химиопрепаратам, было вполне ожидаемым.

Тем не менее мы предполагаем, что первичный скрининг химиотерапевтических препаратов на моделях гомосфероидов, созданных из опухолевых клеток пациентов, может способствовать конкретизации выбираемой тактики лечения, так как почти все исследования инвазивных характеристик опухолевых клеток в трёхмерной системе проводят на постоянных клеточных линиях [20].

Для изучения опухолевого процесса в доклинических исследованиях крайне важно подобрать адекватную модель. Моделирование

in vitro должно предшествовать и дополнять исследования *in vivo* [21]. Адекватность моделирования злокачественных новообразований *in vivo* зависит от точности воспроизведения онкологического заболевания, включающего равные гистопатологические особенности перевиваемых образцов, стадийность, физиологические и системные эффекты. Кроме того, ответ организма как системы должен быть максимально достоверным при применении специфического лечения для точного прогноза терапевтической эффективности [22, 23]. 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.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Финансирование

Исследование поддержано грантом РФФИ #18-29-09014 мк.

ЛИТЕРАТУРА

- Pauli C et al. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine // *Cancer Discov.* 2017;7(5):462–477. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1154
- Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening // *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8. doi: 10.3389/fbioe.2020.00322
- Han SJ, Kwon S, Kim KS. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase // *Cancer Cell Int.* 2021;21(1). doi: 10.1186/s12935-021-01853-8
- Pinto C, Estrada MF, Brito C. In Vitro and Ex Vivo Models — The Tumor Microenvironment in a Flask // *Adv Exp Med Biol.* 2020;1219:431–443.
- Tsuruno Y, Okubo K, Fujiwara T et al. An in vitro model for determining tumor cell migration under metabolic gradients // *Adv Exp Med Biol.* 2018;1072:201–205.
- Bhattacharya S, Calar K, De La Puente P. Mimicking tumor hypoxia and tumor-immune interactions employing three-dimensional in vitro models // *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1). doi: 10.1186/s13046-020-01583-1
- Zanoni M, Pignatta S, Arienti C et al. Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models // *Expert Opin Drug Discov.* 2019;14(3):289–301. doi:10.1080/17460441.2019.1570129
- Bassi G, Grimaudo MA, Panseri S, Montesi M. Advanced multi-dimensional cellular models as emerging reality to reproduce In Vitro the human body complexity // *Int J Mol Sci.* 2021;22(3):1–28. doi: 10.3390/ijms22031195
- Kuen J, Darowski D, Kluge T, Majety M. Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model // *PLoS One.* 2017; 12(7). doi: 10.1371/journal.pone.0182039
- Liu X et al. A novel simple drop chip for 3d spheroid formation and anti-cancer drug assay // *Micromachines.* 2021;12(6). doi: 10.3390/mi12060681
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Danilov AO et al. An improved procedure for autologous gene-modified vaccine preparation for active specific immunotherapy of disseminated solid tumors // *Vopr. Onkol.* 2004.
- Salmon SE. Cloning of Human tumor stem cells: background and overview // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1980;48:3–13.
- Everitt BS, Pickles A. *Statistical Aspects of the Design and Analysis of Clinical Trials.* PUBLISHED BY IMPERIAL COLLEGE PRESS AND DISTRIBUTED BY WORLD SCIENTIFIC PUBLISHING CO., 2004.
- Ulukaya E, Karakas D, Dimas K. Tumor chemosensitivity assays are helpful for personalized Cytotoxic treatments in cancer patients // *Medicina (Kaunas).* 2021;57(6). doi: 10.3390/medicina57060636
- Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation // *J R Soc Interface.* 2017;14(127). doi: 10.1098/rsif.2016.0877
- S. L'Espérance SL, M. Bachvarova M, B. Tetu B et al. Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids // *BMC Genomics.* 2008;9. doi: 10.1186/1471-2164-9-99
- F. Hirschhaeuser F, H. Menne H, C Dittfeld C et al. Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again // *J. Biotechnol.* 2010;148(1):3–15. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012
- Puls TJ, Tan X, Husain M et al. Development of a Novel 3D Tumor-tissue Invasion Model for High-throughput, High-content Phenotypic Drug Screening // *Sci. Rep.* 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-31138-6
- Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? // *Front Mol Biosci.* 2010;7. doi:10.3389/fmolb.2020.00033
- Rebecca VW, Somasundaram R, Herlyn M. Pre-clinical modeling of cutaneous melanoma // *Nat Commun.* 2020;11(1). doi:10.1038/s41467-020-15546-9
- Pabiarzhyn VV, Pashinskaya ES, Semenov VM, Hancharou AY. Methodological aspects of setting up oncological models under experimental conditions // *Vestn. Vitebsk State Med. Univ.* 2018;17(6):32–45. doi: 10.22263/2312-4156.2018.6.32
- Gilazieva Z, Ponomarev A, Rutland C et al. Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine // *Cancers.* 2020;12(10):1–19. doi: 10.3390/cancers12102727

Поступила в редакцию 13.09.2021 г.

*A.B. Danilova, T.L. Nehkaeva, N.A. Efremova,
A.V. Novik, A.U.Zozula, G.I. Gafton, I.A. Baldueva*

**Assessment of the effectiveness of the use
of tumoroids for personalized drug therapies
for solid tumors**

N.N. Petrov National Medicine Research Center
of oncology, St Petersburg, Russia

The approach to the management of malignant tumors, which aims to define the effective curative strategies in each patient, defines the requirement for the elaboration and use of modelling systems that replicate the structures and the biology of human solitary tumors. Three-dimensional cultures of spheroids/tumoroids, which are multi-cell aggregates of malignant cells, can create the intercellular connections of interest, gradients of the nutrients and oxygen, and cell polarity, all of which are absent in the conventional two-dimensional single-layer system.

The present work is dedicated to a comparison study of in vitro viability and invasiveness of solid tumor cells of patients under the effect of chemopreparations and their combinations in view of evaluating the efficacy of the 3D-cell modelling system in the translational personalized medicine context.

Cell cultures of patients who were treated at the N.N. Petrov National Medicine Research Center (NMRC) of oncology were used as a basis for the development of 3D-cell models. N.N. Petrov NMRC in 2015–2021. Tumor tissue pieces were acquired intraoperatively: 1 — leiomyosarcoma (LMS), 1 — rhabdomyosarcoma (RMS), 1 — synovial sarcoma (SS), 2 — myxofibrosarcoma (MFS), 2 — osteogenic sarcoma (OS), 1 — skin melanoma (MC), 1 — breast cancer (BC) (n=9).

Our individual comparison of the effectiveness of in vitro chemotherapeutic agents against tumor cells of various origins cultivated in 2D and 3D-model systems with real clinically relevant cases confirmed that the monolayer culture as the test system was less adequate for selecting and personalizing the treatment of malignant tumor patients: the 3D cell system proved itself in 77.7% of cases, and the monolayer culture — in 44.4% of cases. The combination of doxorubicin/iforsfamide and paclitaxel significantly suppressed the motility in the matrigel of spheroid cells, but did not affect tumor cell viability, which was seen in all but OS #921 and MK #929 cases.

The cultivation of tumor cells in form of spheroids/tumoroids allows to utilize them as more adequate pre-clinical model as individual predictive test-system, enabling the personalized selection of therapy.

Key words: malignant tumors, spheroids, tumoroids, chemoresistance, doxorubicin, isophosphamide, paclitaxel