

Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro*

Р.Н. Мингалева, В.В. Соловьева, Н.Л. Блатт, А.А. Ризванов
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Application of cell and tissue cultures for potential anti-cancer/oncology drugs screening *in vitro*

R.N. Mingaleeva, V.V. Solovieva, N.L. Blatt, A.A. Rizvanov
Kazan Federal University, Kazan, Russia

Одной из причин провала потенциальных противоопухолевых препаратов на стадии клинических исследований является несовершенство существующих систем доклинического скрининга. Возможно, наиболее важна стадия тестирования *in vitro*, когда из множества веществ необходимо отобрать всего несколько, отвечающих заданным свойствам. Эффективная система скрининга должна быть максимально приближена по свойствам и по организации к естественной опухоли. Клеточные культуры были и остаются наиболее простыми в техническом исполнении *in vitro* моделями опухолей. Однако по многим параметрам культуры клеток отличаются от естественных опухолей. Разработано несколько моделей, которые позволяют более полно имитировать опухоль и ее микроокружение, по сравнению с простыми монослойными культурами. Примером могут служить трехмерные культуры. Кроме того, развиваются гистологические методы тестирования противоопухолевых препаратов. В данном обзоре изложены современные *in vitro* модели, которые могут быть использованы для проверки активности потенциальных лекарственных веществ, способных подавлять рост опухолевых клеток.

Ключевые слова: культура клеток, скрининг противоопухолевых препаратов, трехмерные модели клеточных культур.

Высокопроизводительные методы геномных и протеомных исследований внесли значительный вклад в понимание биологии онкологических заболеваний, что послужило основой для развития систем скрининга противоопухолевых веществ, позволило идентифицировать и внедрить в клиническую практику множество соединений с потенциальной способностью подавлять рост трансформированных клеток [1]. Однако на сегодняшний день действие противоопухолевых препаратов ограничено всего несколькими десятками видов клеточных белков-мишеней. Исследовательская программа Центра рака Мура (Moore's Cancer Center) при Университете Калифорнии в Сан-Диего (США) показала, что число эффективных мишеней для противоопухолевых препаратов колеблется между 1000 и 4000. Кроме того, эффективность препаратов в значительной степени зависит от индивидуальных особенностей организма конкретного пациента. Это вызывает большие трудности при разработке эффективных методов скрининга препаратов и при проведении доклинических испытаний. Рационально проведенный первичный скрининг и доклинические исследования потенциальных противоопухолевых препаратов позволяют существенно снизить затраты на разработку эффективных и безопасных лекарственных средств.

One of the reasons for the failure of potential anticancer drugs in clinical trials is the imperfection of existing preclinical screening systems. Perhaps the most important step is *in vitro* testing during which several substances with certain properties should be selected from a large number of substances. An effective system of screening should closely resemble the organization of naturally occurring tumors. Cell cultures are the most simple from technical point of view *in vitro* models of tumors. However, in many respects cell cultures different from natural tumors. Several models which are more accurately (compared to simple monolayer cultures) emulate the tumor and its microenvironment are developed. An example is three-dimensional cultures. Furthermore, additional methods of anticancer drugs testing are developed based on tissue slice cultures. This review describes current *in vitro* models which can be used to test the activity of potential drugs for use in treating of oncological diseases.

Key words: cell culture, screening of anticancer drugs, three-dimensional model of cell cultures.

Многообразие онкологических заболеваний

Формирование любой опухоли начинается с трансформации клеток. Трансформация может проходить в любой части организма и практически из любого типа клеток. Множество заболеваний, в основе которых лежит опухолевая трансформация клеток, поражает своим разнообразием. Выделяют более 100 видов опухолей, без учета подтипов в специфических органах [2]. Наиболее простой классификацией новообразований является деление их на доброкачественные и злокачественные. Доброкачественные опухоли включают высокодифференцированные клетки и отличаются экспансивным ростом, при котором опухоль медленно увеличивается и раздвигает прилежащие ткани. Для злокачественных новообразований характерна инвазия в прилежащие к ней ткани и метастазирование. Метастазы являются основной причиной смертности среди онкологических больных. Процесс метастазирования включает следующие основные этапы: локальную инвазию, интравазацию, циркуляцию в кровотоке, экстравазацию и колонизацию (заселение) ткани и (или) органа [3]. В процессе инвазии происходит нарушение межклеточной адгезии, повышение мобильности опухолевых клеток, в результате чего они проникают в окружающие ткани. При интравазии, опухолевые

e-mail: rizvanov@gmail.com

клетки проходят через эндотелиальный барьер и попадают в системный кровоток. Выжившие в кровотоке клетки в процессе экстравазии прикрепляются к сосудам в отдаленных районах, проникают в окружающие ткани и начинают образовывать метастазы в новых условиях окружения [4].

Выделяют шесть признаков, или свойств («признаки опухоли»), общих для большинства злокачественных новообразований: 1) самодостаточность в ростовых сигналах; 2) нечувствительность к антиростовым сигналам; 3) устойчивость к апоптозу; 4) неограниченный репликативный потенциал; 5) непрерывный ангиогенез; 6) тканевая инвазия и метастазирование [5]. Однако сложность и разнообразие изменений, наблюдаемых в опухолевых клетках, не ограничиваются изменениями в указанных выше процессах. Даже в пределах одного новообразования наблюдается микрогетерогенность клеток, которая делает опухоль каждого конкретного пациента уникальной [2].

Современные способы борьбы с опухолями

Одним из основных методов лечения большинства опухолей является их хирургическое удаление, однако существует риск, что в организме останется часть трансформированных клеток, которые в дальнейшем могут стать причиной рецидива заболевания. Другими традиционными методами лечения являются лучевая и химиотерапия, но некоторые виды опухолей по не всегда ясным причинам устойчивы к этим видам воздействия. Даже после успешных циклов лечения, зачастую, опухоль исчезает не полностью, приобретает устойчивость к терапии или «уходит» в состояние покоя, чтобы позже вернуться в более агрессивной форме [6]. Традиционная терапия имеет множество нежелательных побочных эффектов, главным из которых является ненаправленное действие препаратов, вследствие чего поражаются нормальные клетки организма. Альтернативным направлением в разработке противоопухолевых лекарств является таргетная терапия, действие которой должно проявляться только в опухолевых клетках. Нацеленность терапии может быть достигнута методами генной инженерии, например, при воздействии на дефектные гены, которые определяют «признаки опухоли», или при использовании моноклональных антител, специфичных к маркерам, характерным для той или иной опухоли. Успешное подавление роста опухолевых клеток при блокировании ключевых дефектных генов показано в ряде исследований [7–9]. Но, как оказалось, для полного исчезновения опухоли недостаточно подавить только один из «признаков опухоли» — необходимо блокировать большинство, если не все, потенциальные пути опухолеобразования, что оказалось сложной задачей [2]. Следующим препятствием к использованию геннотерапевтических препаратов в онкологической практике оказалась сложность доставки ДНК или РНК потенциального терапевтического воздействия во все опухолевые клетки, что привело к широкому развитию области, ведущей поиск нацеленных и безопасных систем доставки геннотерапевтических препаратов в опухоль [10]. Еще одним направлением, находящимся на стадии разработки, является иммунотерапия, в частности клеточная иммунотерапия, благодаря которым к опухоли интенсивно привлекаются клетки иммунной системы [8]. Несмотря на успехи на текущем этапе исследований универсальный противоопухолевый препарат не разработан, поиск эффективных

противоопухолевых веществ так же актуален, как и десятилетия тому назад.

Панель опухолевых клеток

Современный протокол фармацевтического скрининга был принят в 1990 году Национальным Институтом Рака (National Cancer Institute, NCI, США) и включает тестирование веществ на панели из 60 клеточных линий человека опухолевого происхождения (табл. 1). На сегодняшний день этот тест, получивший название NCI60, наиболее часто используемый тест для предварительного скрининга противоопухолевых препаратов [11].

Преимущество NCI60 состоит в том, что каждая из 60 клеточных линий формирует специфический ответ на тестируемое вещество, что позволяет получить уникальный набор (паттерн) биологических эффектов, который в дальнейшем можно сравнить с уже известными паттернами с помощью алгоритма COMPARE [12] и сделать предположение о механизме действия тестируемого вещества или, при отсутствии в базе данных подобных паттернов, предположить, что механизм действия вещества отличается от ранее описанных. Кроме того, если удастся идентифицировать различные молекулярные мишени в 60 клеточных линиях, то появляется возможность выбрать те вещества, которые с большой долей вероятности взаимодействуют со специфическими молекулярными мишенями.

Синтетические соединения или натуральные вещества отбираются по их способности подавлять рост или вызывать гибель клеток в культуре *in vitro*. На первом этапе скрининга к трем высокочувствительным клеточным линиям человека MCF-7 (карцинома молочной железы), NCI-H460 (карцинома легких) и SF-268 (глиома) добавляют исследуемое вещество в стандартной концентрации и проводят инкубацию в течение 48 ч. В основе NCI60 лежит SRB-метод определения жизнеспособности клеточных культур с использованием розового анионного красителя сульфородамина В [13]. Если исследуемое вещество подавляет рост, по крайней мере, одной клеточной линии, оно переходит на следующий этап тестирования на полной панели из 60 клеточных линий. Теперь вещество добавляют к клеткам в пяти различных концентрациях. Вещество проходит на стадию скрининга *in vivo*, если по результатам тестирования на полной панели оно оказалось способным: вызывать гибель клеток хотя бы одной клеточной линии; имеет уникальный механизм действия и (или) может подавлять рост клеток в очень низкой концентрации. Для удобства все используемые в анализе клеточные линии сгруппированы в соответствии с типами опухолей, из которых они были получены. В результате, вместо анализа 60 отдельных клеточных линий, исследователь имеет дело с 9 группами онкологических заболеваний: лейкоз, меланома, опухоли центральной нервной системы, рак легких, толстой кишки, яичников, молочной железы, почки и предстательной железы. Такая система позволяет проводить быстрый скрининг цитотоксичности потенциальных противоопухолевых веществ. При этом основное внимание уделяется не самому препарату (compound-oriented), для которого предсказан определеннный биологический эффект, а заболеванию, по отношению к которому препарат показал потенциальный терапевтический эффект (disease-oriented) [1].

Перечень клеточных линий, используемых в анализе NCI60

№	Название клеточной линии	Онкологи-ческая группа	№	Название клеточной линии	Онкологи-ческая группа	№	Название клеточной линии	Онкологи-ческая группа
1	CCRF-CEM	Лейкоз	21	A549/ATCC	Рак легких	41	COLO 205	Рак толстой кишки
2	HL-60(TB)		22	EKVX		42	HCC-2998	
3	K-562		23	HOP-62		43	HCT-116	
4	MOLT-4		24	HOP-92		44	HCT-15	
5	RPMI-8226		25	NCI-H226		45	HT29	
6	SR		26	NCI-H23		46	KM12	
7	SF-268	Опухоли центральной нервной системы	27	NCI-H322M	Рак предстательной железы	47	SW-620	Рак яичников
8	SF-295		28	NCI-H460		48	IGR-OV1	
9	SF-539		29	NCI-H522		49	OVCAR-3	
10	SNB-19		30	PC-3		50	OVCAR-4	
11	SNB-75		31	DU-145		51	OVCAR-5	
12	U251		32	LOX IMVI	Меланома	52	OVCAR-8	Рак молочной железы
13	786-0	Рак почки	33	MALME-3M		53	NCI/ADR-RES	
14	A498		34	M14		54	SK-OV-3	
15	ACHN		35	MDA-MB-435		55	MCF7	
16	CAKI-1		36	SK-MEL-2		56	MDA-MB-231/ATCC	
17	RXF 393		37	SK-MEL-28		57	MDA-MB-468	
18	SN12C		38	SK-MEL-5		58	HS 578T	
19	TK-10		39	UACC-257		59	BT-549	
20	UO-31		40	UACC-62		60	T-47D	

Одним из важнейших вкладов NCI60 в развитие химиотерапии онкологических заболеваний было открытие противоопухолевых свойств бортезомида (PS-341) – препарата для лечения миеломы [14]. PS-341 (дипептид борной кислоты) обратимо ингибирует химотрипсиноподобную активность протеасомы 26S – белкового комплекса, который катализирует расщепление основных белков и регулирует их внутриклеточные концентрации. PS-341 проявляет высокую цитотоксичность по отношению к широкому спектру опухолевых клеток человека и индуцирует апоптоз при низких наномолярных концентрациях [15].

Ежегодно в тестировании на стадии *in vitro* в NCI60 задействовано примерно 2500 соединений и только 2% из них оказываются достаточно эффективны, чтобы перейти к стадии тестирования на мышах. Однако даже вещества, показавшие эффективность в системе *in vitro*, зачастую демонстрируют низкую корреляцию *in vivo* [16, 17]. Отчасти это можно объяснить тем, что при скрининге веществ в такой системе не учитывается, что на клетки организма воздействуют такие различные факторы микроокружения, как межклеточная коммуникация, аутокринная и паракринная регуляция, а также взаимодействие клеток с трехмерным внеклеточным матриксом (BM) [18].

Псевдодвухмерные модели

Отдельное направление исследований – создание псевдодвухмерных моделей взаимодействия трансформированных (опухолевых) и нормальных (соматических, в том числе стволовых) клеток с

использованием BM. При ко-культивировании флуоресцентно меченых мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (MMCK) из зачатков третьего месяца человека (CD29⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD166⁺, CD14⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD133⁻) и клеток нейробластомы человека SH-SY5Y на тонком слое Матригеля (аналог внеклеточного матрикса) мы наблюдали быструю самоорганизацию MMCK и клеток SH-SY5Y с образованием блюдцеподобных образований, в центре которых располагались MMCK, а по периферии – «ореол» из клеток SH-SY5Y (рис.) [19]. Этот вид самоорганизации ко-культуры может отражать характер взаимодействия опухолевых и стволовых клеток во время метастазирования опухоли. Ранее рядом исследователей было показано, что кроветворные клетки-предшественницы, полученные из костного мозга, могут формировать кластеры-ниши для заселения опухолевыми клетками при метастазировании [20]. Хотя клетки SH-SY5Y продемонстрировали медленный рост на Матригле, они активно росли вокруг агрегатов MMCK в ко-культуре. Дополнительные исследования показали, что присутствие в ко-культуре MMCK значительно повышало жизнеспособность клеток SH-SY5Y в условиях окислительного стресса. Данное наблюдение согласуется с предыдущими работами, в которых было показано, что опухолевые клетки проявляют более устойчивый фенотип в трехмерных *in vitro* моделях по сравнению с однослойными культурами [21, 22]. Интересно, что MMCK показали значительную устойчивость к окислительному стрессу, что может быть связано с низким эндогенным уровнем

активных форм кислорода (АФК) у стволовых клеток [23, 24] и опухолевых стволовых клеток [25]. Кроме того, ММСК в ко-культуре с опухолевыми клетками также приобрели большую жизнеспособность в условиях окислительного стресса, поскольку известно, что опухолевые клетки активно секретируют различные биологически активные молекулы, обладающие защитными свойствами (например, способствующие выживанию, пролиферации и метастазированию опухолевых клеток). Таким образом, предложенная нами модель взаимодействия стволовых и опухолевых клеток может быть полезной при моделировании различных онкологических процессов *in vitro*.

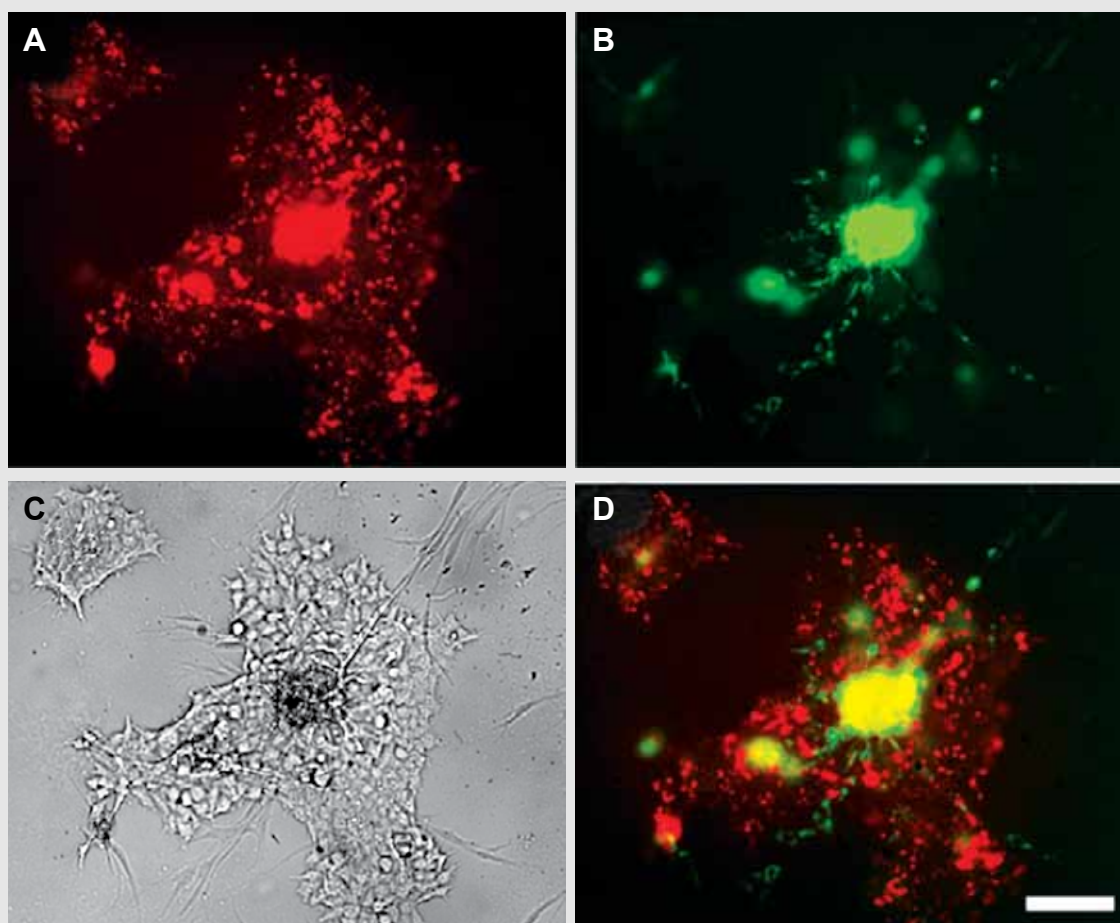
Модифицированная камера Бойдена

Изначально камера Бойдена, двухполостная камера с полупроницаемой мембраной, широко использовалась для изучения хемотаксической активности лейкоцитов и других неадгезивных *in vitro* клеток, а также хемоаттрактантной активности веществ, выделяемых различными типами клеток [26]. Хемотаксическая активность клеток оценивалась путем аспирации среды в одном из отсеков

камеры и определением количества мигрировавших клеток с использованием спектрофотометра или гемоцитометра [27, 28].

В настоящее время камеру Бойдена адаптировали также для исследования миграции опухолевых клеток через монослой эндотелиоцитов или фильтр, покрытый Матригелем, под действием различных хемоаттрактантов, что имитирует процесс инвазии в естественных условиях [29]. При скрининге противоопухолевых препаратов оценивается их способность подавлять процесс миграции опухолевых клеток. Опухолевые клетки после прохождения мембраны адгезируются на ее нижней стороне, поэтому для детекции их метят флуоресцентными или радиоактивными метками. Однако основными недостатками данной модели является отсутствие прямого межклеточного взаимодействия, что не позволяет модели в полной мере имитировать опухоль *in vivo*.

Доклинические исследования анти-ангиогенного и противоопухолевого препарата SIMO10603 включали изучение его влияния на хемотаксис VEGF-индуцированных эндотелиальных клеток аорты свиньи PAE-KDR, сверхэкспрессирующих KDR,



Ко-культура мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и клеток нейробластомы SH-SY5Y, 4-е сут. культивирования на Матригеле [19]:

А – SH-SY5Y, меченные PKH26 (красная флуоресценция);

В – ММСК, меченные PKH67 (зеленая флуоресценция);

С – культура при фазово-контрастной световой микроскопии;

Д – совмещение изображений панелей А и В.

Масштабный отрезок – 100 мкм

с использованием модифицированной камеры Бойдена. Было показано, что SIM010603 дозозависимо ингибирует хемотаксис данной клеточной линии, что указывает на его анти-ангиогенные свойства [30]. В других исследованиях с использованием камеры Бойдена было показано, что препарат LJJ-10 ингибирует миграцию и инвазию клеток остеосаркомы U-2 OS [31]. Оба препарата являются ингибиторами рецепторов тирозин-киназы. Также с помощью рассматриваемой модели была продемонстрирована эффективность препарата Trichostatin A (TSA, ингибитор гистондеацетилазы) в подавлении инвазии клеток остеосаркомы [32].

Микрофлюидные системы

Микрофлюидные системы имеют большой потенциал в исследовании миграции опухолевых клеток при воздействии на них тестируемого препарата. Система состоит из камеры, имеющей два канала для доставки реагентов. Клетки в ростовой среде или в составе BM (например, Матригеля) вводятся в один из каналов и прикрепляются ко дну камеры. Затем в другой канал вводят тестируемое вещество с градиентом концентрации и наблюдают за миграцией клеток в ответ на исследуемое вещество. При использовании такой камеры расход клеток и тестируемого вещества минимален, однако требуется ежедневная замена ростовой среды. На сегодняшний день микрофлюидные системы находятся на стадии упрощения и автоматизации, что сделает их использование доступным и легким. Микрофлюидные системы открывают перспективу одновременного управления несколькими параметрами микроокружения [33].

Трехмерные модели клеточных культур

В настоящее время развиваются трехмерные модели культивирования клеток, в которых, в отличие от плоской поверхности, на которой выращивают монослойные культуры, клетки растут либо в трехмерном окружении, либо внутри матрикса или каркаса с трехмерной архитектурой. При таком способе культивирования клетки из монослоя переходят в многослойную культуру, образуя модель тканей опухоли [22]. Транспорт лекарственных препаратов к клеткам-мишеням в таких структурах имеет ряд препятствий, таким образом имитируются физиологические барьеры, влияющие на доставку лекарств *in vivo* [18].

Модель многоклеточных сфероидов

Наиболее исследованной является модель многоклеточных сфероидов [34]. Сфероиды представляют собой самоорганизованные сферические кластеры-колонии с тканеподобной архитектурой [35]. Клетки в сфероиде приобретают большее сходство с клетками естественной опухоли, чем те же клетки, выращенные в монослойной культуре [35, 37]. Морфологическое сходство сфероидов с опухолью связано с потерей опухолевыми клетками неестественной распластанной морфологии, характерной для монослойной культуры [38]. В составе крупных (более 500 мкм) сфероидов можно условно выделить три зоны клеток: в центре находится зона погибших клеток, окруженная внутренним слоем живых покоящихся клеток, снаружи от которого расположена зона активно пролиферирующих клеток [39]. Такое же строение имеют районы плотных опухолей

с плохой васкуляризацией, что связано с затруднением диффузии питательных веществ и кислорода к центральным клеткам, а также со сложностью вывода продуктов метаболизма [40]. Подобно опухоли *in vivo*, сфероид формирует внеклеточный матрикс [41], межклеточные взаимодействия и взаимодействия клеток с матриксом [42]. Клетки в сфероиде дифференцируются подобно опухоли *in vivo* и сохраняют состояние дифференцировки в течение нескольких недель [43]. Различаются и профили экспрессии генов, отвечающих за ангиогенез, миграцию и инвазию клеток [35]. В сфероиде клетки растут медленнее, чем те же клетки, выращенные в монослое на плоской поверхности [36, 44]. Повышенная выживаемость клеток в сфероиде связана с минимизацией метаболизма, расхода АТФ и кислорода в агрегатах по сравнению с монослойной культурой [40]. Так же как для солидных опухолей и метастазов *in vivo*, рост сфероидов можно моделировать с помощью математических моделей, применимых для описания опухолей [45].

Новые свойства опухолевых клеток, общие для сфероидов и опухолей *in vivo*, определяют изменение чувствительности ко многим противоопухолевым препаратам по сравнению с монослойными культурами [39, 46, 47]. Механизм приобретения устойчивости к лекарственным препаратам, вероятно, связан с усилением межклеточных взаимодействий, на которое влияют клеточная адгезия, растворимые факторы, вырабатываемые опухолевыми клетками, и микроокружение (например, низкий pH и гипоксия) [18].

Традиционным методом получения сфероидов являются культивирование клеток в «висячих каплях» на неадгезивных поверхностях с использованием конических центрифужных пробирок или биореакторов [39, 48]. Низкая производительность стандартных способов получения сфероидов и образование большого числа агрегатов разного размера создают некоторые трудности в широком применении данной модели для скрининга веществ. На сегодняшний день достигнуты большие успехи в автоматизированном получении сфероидов [34, 47]. С помощью данных систем можно проводить эксперименты, используя такие высокопроизводительные приборы, как планшетные спектрофотометры, автоматизированные системы визуализации и анализа [47]. Примером могут служить микрофлюидные системы с точным геометрическим ограничителем, с помощью которых можно получить сфероиды одинакового размера в высокой концентрации для дальнейшего более точного определения эффективности противоопухолевых препаратов [18].

Трехмерные культуры можно использовать для исследования цитотоксичности препаратов на нормальных клетках, например, на гепатоцитах. В отличие от монослойной культуры гепатоцитов, эти же клетки, организованные в сфероид, имеют повышенную выживаемость и надолго сохраняют способность к метаболизированию вредных веществ [39, 40, 43, 44].

Недостатком трехмерных культур является трудность наблюдения за клетками. Несмотря на разработку систем визуализации, предназначенных для отслеживания изменений, происходящих с клетками в трехмерных структурах, примером которой является флуоресцентный микроскоп, основанный на принципе LSM (Light Sheet-based Fluorescence Microscopy) [49], более доступной на сегодняшний

день является так называемая «сэндвич»-система, в которой монослой опухолевых клеток помещается в узкий зазор между двумя предметными стеклами. Рост клеток приводит к формированию ядра, содержащего некротические клетки, с прилегающими к нему снаружи двумя слоями живых клеток, то есть образуется аналог среза с поперечного сечения сфероиды. Преимущество такой структуры в том, что все клетки можно рассмотреть под микроскопом, в отличие от сфероиды, когда для анализа необходимо провести фиксацию и получить срезы. Кроме того, любой из слоев клеток может быть изолирован от общей структуры простым поднятием верхнего стекла, после чего клетки можно анализировать вне «сэндвич»-системы [50].

Несмотря на все достоинства, модель многоклеточных сфероидов не полностью соответствует ткани *in vivo*, поскольку сфероиды, выращенные *in vitro*, не участвуют в иммунном ответе и в них не наблюдается ангиогенез [18, 42]. При попытках создать эффективную систему скрининга противоопухолевых веществ обнаружили, что взаимодействие нормальных клеток, прилежащих к опухоли, с опухолевыми клетками определяет агрессивность опухоли и ее ответ на противоопухолевые препараты [51, 52]. Генетические мутации клеток стромы, прилежащих к опухоли, при некоторых онкологических заболеваниях, а также участие этих клеток в приобретении устойчивости опухоли к терапевтическим препаратам подтверждают эту теорию [53].

Трехмерные культуры, выращенные с использованием матрикса

ВМ играет роль структурной поддержки клеток в ткани и является важным компонентом клеточного микроокружения. Благодаря различной природе и составу ВМ способен выполнять ряд других важных функций, включая регулирование межклеточного взаимодействия [54]. Таким образом, включение компонентов ВМ в систему *in vitro* позволяет получить трехмерную структуру с более точной имитацией клеточного микроокружения. На основе природного ВМ получены гидрогели, то есть каркасы с большим содержанием воды для роста клеток, которые состоят из коллагена, фибрина, гиалуроновой кислоты, Матригеля и др. Также природные гидрогели могут быть получены из других биологических источников, примером могут служить хитозан и алгинат. Такие гели биосовместимы и биоактивны [55]. Однако сложный характер природного ВМ [54] ограничивает его применение в системе *in vitro* в связи со сложностью стандартизации и интерпретации биологического действия отдельных компонентов ВМ. Вот почему синтетический внеклеточный матрикс (например, изготовленный из полиэтиленгликоля или поливинилового спирта) становится привлекательной заменой для трехмерных моделей *in vitro* с потенциально хорошей корреляцией результатов *in vitro* и *in vivo* [55–57]. Матрицы на основе синтетических материалов являются химически чистыми, не содержат нехарактеризованные ростовые факторы и другие «загрязняющие» вещества. Кроме того, их достаточно просто получить. Недостатком синтетических гидрогелей является отсутствие сигнальных молекул, которые секретируются клетками тканей в природный ВМ [44]. Поскольку состав и плотность трехмерной матричной системы можно эксперимен-

тально контролировать, подобная система может более адекватно имитировать естественное микроокружение клеток и может быть применена для конкретных типов клеток с различной морфологией и поведением. Также существуют гибридные матрицы, которые представляют собой синтетический каркас, содержащий молекулы пептидов, встречающиеся в составе белков природного ВМ. Часто в составе гибридной матрицы можно встретить пептид, содержащий мотив RGD (Arg-Gly-Asp), который присутствует в составе фибронектина, витронектина и фибриногена [58]. Такая сшивка позволяет матрице эффективно связывать большинство интегринов клетки, что приводит к усилению клеточной адгезии, когда это необходимо [44, 58]. Применение матриц для формирования трехмерных структур позволяет исследовать миграцию клеток, инвазию, метастазирование и ангиогенез при воздействии различных противоопухолевых препаратов.

Микроокружение опухоли можно моделировать, используя для этого гетерологичные трехмерные культуры, которые состоят из опухолевых клеток и стромальных фибробластов, остеоцитов, нейронов, макрофагов, эпителиальных или эндотелиальных клеток [44, 46, 59]. При ко-культивировании клеток можно использовать каркас из ВМ [59], а можно обойтись без него, вырастив обе культуры в составе одного сфероиды [48]. Такие системы ко-культивирования можно использовать для тестирования лекарств и для скрининга агентов, действующих на взаимодействие опухолевой и нормальной клетки микроокружения. Гетерогенные культуры сохраняют ряд преимуществ, присущих отдельным культурам, также сохраняются межклеточные взаимодействия и взаимодействие клеток с матриксом [43]. С помощью таких культур исследуют влияние противоопухолевых веществ на инвазию и метастазирование [39].

Многоклеточные слои

Многоклеточные слои представляют собой разновидность трехмерных культур, разработанные для прямого измерения диффузии лекарственных препаратов в опухолевом микроокружении [60]. В этой модели клетки выращивают на микропористой тефлоновой мембране, покрытой коллагеном. Мембрану погружают в большой объем ростовой среды и постоянно помешивают. Это приводит к формированию симметричного многоклеточного слоя с ядром из некротических клеток и окружающих его живых тканей. Такой многоклеточный слой можно получить для многих клеточных линий, даже для тех, которые не образуют сфероиды [18]. Важное преимущество такой культуры перед другими моделями трехмерных структур состоит в возможности прямого измерения потока лекарственных препаратов через многоклеточный слой. Для этого исследуемое вещество добавляют с одной стороны от мембраны и измеряют кинетику его появления с другой стороны, используя аналитические методы, например, высокоэффективную жидкостную хроматографию [60]. Это свойство сделало многоклеточные слои отличным инструментом для исследования внесосудистого транспорта противоопухолевых веществ, таких как низкомолекулярные лекарственные препараты, пролекарства и макромолекулярные агенты [18].

Использование модели многоклеточных слоев для исследования проникновения в опухоль противораковых лекарств проиллюстрировано на примере гипоксического цитотоксина тирапазамина (hypoxia-selective cytotoxin tirapazamine, TPZ), который в настоящее время проходит третью фазу клинических исследований. TPZ проявляет высокую селективную цитотоксичность по отношению к клеткам, находящимся в условиях гипоксии [61]. Гипоксические клетки представляют собой важную целевую популяцию в опухолях из-за их устойчивости к радио- и некоторым формам химиотерапии. Также показана их роль в прогрессировании опухоли [62]. Исследования с многоклеточными сфероидными V79 показали снижение активности TPZ по отношению к клеткам «ядра» в условиях гипоксии всего сфероида. Это свидетельствует о том, что способность TPZ проникать через ткани в состоянии гипоксии может быть ограничено в связи с быстрой метаболической деградацией препарата [63]. Данное предположение было подтверждено в дополнительных экспериментах с многоклеточными сфероидными V79, в которых показано снижение транспорта TPZ в условиях полного отсутствия кислорода (аноксия) [64], и с клетками карциномы мочевого пузыря человека MGH-U1.

Гистологические методы анализа

Широко используемым методом моделирования естественного микроокружения является органотипическая модель, в которой получают тканевые экспланты. В данной системе часть живой ткани опухоли пациента удаляют, затем с помощью вибратора готовят срезы толщиной 400 мкм, которые инкубируют *in vitro* в течение нескольких суток. Использование этого метода позволяет сохранить основную архитектуру ткани и индивидуальную вариабельность опухоли [49]. Тканевые экспланты используются почти во всех областях биомедицинских исследований. Однако и такая модель имеет недостатки, такие как сложность в получении образцов, стандартизации и этических ограничениях [39, 53].

Для исследования инвазии опухолевых клеток в головной мозг млекопитающих была разработана *in vitro* модель, объединившая камеру Бойдена и органотипическую модель срезов мозга [65, 66]. Обычные фильтры, используемые в камере Бойдена, например покрытые Матригелем, не могут обеспечить необходимые для инвазии сигналы. Такие сигналы вырабатываются при прямом контакте опухолевых клеток с нормальными клетками мозга. Если в качестве фильтра в камере Бойдена использовать срезы тканей мозга, то такие сигналы сохраняются и появляется возможность исследовать механизм опухолевой миграции и тестировать противоопухолевые препараты, действующие на инвазию клеток [65]. Так же как и сами тканевые экспланты, эта модель имеет проблемы со стандартизацией изготовления органотипических культур. Кроме того трехмерная архитектура затрудняет наблюдение за состоянием клеток в режиме реального времени.

Альтернативной является модель органотипического ко-культивирования, при которой миелиновые

аксоны эмбриона цыпленка культивируют совместно с опухолевыми клетками. Глиомные клетки помещают вблизи эксплантов (при этом два компонента системы не соприкасаются) и наблюдают за их инвазией [67]. В связи с двумерной организацией подобной системы возможно наблюдение *in vitro* за поведением живых клеток при помощи видеоскопии в реальном времени. Тем не менее, остается проблема стандартизации и интерпретации таких органотипических культур. Любая система на основе органотипических культур содержит множество различных типов клеток и, хотя подобная гетерогенность позволяет точнее моделировать клеточное микроокружение, контроль за поведением и анализ отдельных клеточных субпопуляций остается непросто задачей.

Заключение

Человечество долгое время ведет поиски эффективной системы скрининга противоопухолевых веществ *in vitro*. Сначала это было тестирование только на монослойных опухолевых клеточных линиях, затем появились трехмерные модели культивирования опухолевых клеток, что значительно приблизило систему скрининга к реальной ситуации в тканях *in vivo*. Актуальными остаются и гистологические методы исследования. На сегодняшний день разработано множество систем скрининга, но ни одна из них не гарантирует полную корреляцию данных *in vitro* и *in vivo*. У каждой из систем имеются серьезные недостатки. Следовательно, используя для тестирования противоопухолевых веществ только один из способов, мы получаем ограниченное представление о действии вещества на клетки. Для получения достоверных результатов целесообразно проверять сходимость результатов, полученных при использовании разных способов тестирования, выводить системы тестирования на уровень высокопроизводительного скрининга, повышать возможности систем визуализации клеток. Возможно, развитие тканевой инженерии или исследование действия и привлечение в имеющиеся системы «стволовых опухолевых» клеток позволит улучшить предиктивность систем скрининга противоопухолевых веществ. Очевидно, что для точной интерпретации биологических эффектов необходим компромисс между сложностью системы и способностью исследователя анализировать сложные взаимодействия среди различных клеточных компонентов.

Благодарности

Работа частично финансировалась грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований 13-04-00255-а, грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых докторов наук МД-433.2013.4, соглашением ФЦП № 14.А18.21.0113 Министерства образования и науки Российской Федерации, федеральным центром коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и научно образовательным центром фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Damia G., D'Incalci M. Contemporary pre-clinical development of anticancer agents-what are the optimal preclinical models? *Eur. J. Cancer*. 2009; 45(16): 2768–81.
2. Sverdllov E. Not gene therapy, but genetic surgery – the right strategy to attack cancer. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* 2009; 24(3): 93–113.
3. Nguyen D.X., Bos P.D., Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer*. 2009; 9(4): 274–84.
4. Wu Y., Zhou B.P. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008; 40(7): 643–50.
5. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57–70.
6. Felsner D.W. Tumor dormancy and oncogene addiction. *Apmis* 2008; 116(7-8): 629–37.
7. Cheng T.L., Teng C.F., Tsai W.H. et al. Multitarget therapy of malignant cancers by the head-to-tail tandem array multiple shRNAs expression system. *Cancer Gene Ther.* 2009; 16(6): 516–31.
8. Seth P. Vector-mediated cancer gene therapy: an overview. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4(5): 512–7.
9. Xue W., Zender L., Miething C. et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007; 445(7128): 656–60.
10. Wagner E. Advances in cancer gene therapy: tumor-targeted delivery of therapeutic pDNA, siRNA, and dsRNA nucleic acids. *J. Buon.* 2007; 12(Suppl 1): S77–82.
11. Shoemaker R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer*. 2006; 6(10): 813–23.
12. Paull K.D., Shoemaker R.H., Hodes L. et al. Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989; 81(14): 1088–92.
13. Skehan P., Storeng R., Scudiero D. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82(13): 1107–12.
14. Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 2002; 7(1): 9–16.
15. Adams J., Palombella V.J., Sausville E.A. et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999; 59(11): 2615–22.
16. Johnson J.I., Decker S., Zaharevitz D. et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br. J. Cancer*. 2001; 84(10): 1424–31.
17. Peterson J.K., Houghton P.J. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. *Eur. J. Cancer*. 2004; 40(6): 837–44.
18. Elliott N.T., Yuan F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J. Pharm. Sci.* 2010; 100(1): 59–74.
19. Rizvanov A.A., Yalvac M.E., Shafigullina A.K. et al. Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuroblastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: A novel system for modeling cancer cell micro-environment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010; 76(2): 253–9.
20. Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438(7069): 820–7.
21. Evenson A., Mowschenson P., Wang H. et al. Hyalinizing trabecular adenoma – an uncommon thyroid tumor frequently misdiagnosed as papillary or medullary thyroid carcinoma. *Am. J. Surg.* 2007; 193(6): 707–12.
22. Padron J.M., van der Wilt C.L., Smid K. et al. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000; 36(2-3): 141–57.
23. Ito K., Hirao A., Arai F. et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004; 431(7011): 997–1002.
24. Smith J., Ladi E., Mayer-Proschel M., Noble M. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *PNAS USA* 2000; 97(18): 10032–7.
25. Diehn M., Cho R.W., Lobo N.A. et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 780–3.
26. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 1962; 115: 453–66.
27. Brown N., Bicknell R. Cell migration and the boyden chamber. *Meth. Mol. Med.* 2001; 58: 47–54.
28. Chen H. Cell migration: developmental methods and protocols. *Meth. Mol. Biol.* 2005; New Jersey: Springer. p. 15–22.
29. Li Y.H., Zhu C. A modified Boyden chamber assay for tumor cell transendothelial migration in vitro. *Clin. Exp. Metastasis*. 1999; 17(5): 423–9.
30. Wang D., Tang F., Wang S. et al. Preclinical anti-angiogenesis and anti-tumor activity of SIM010603, an oral, multi-targets receptor tyrosine kinases inhibitor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2012; 69(1): 173–83.
31. Chen K.T., Hour M.J., Tsai S.C. et al. The novel synthesized 6-fluoro-(3-fluorophenyl)-4-(3-methoxyanilino)quinazoline (LJJ-10) compound exhibits anti-metastatic effects in human osteosarcoma U-2 OS cells through targeting insulin-like growth factor-I receptor. *Int. J. Oncol.* 2011; 39(3): 611–9.
32. Cheng D.D., Yang Q.C., Zhang Z.C. et al. Antitumor activity of histone deacetylase inhibitor trichostatin A in osteosarcoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012; 13(4): 1395–9.
33. Hukower K., Herber R. Cell Migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics* 2011; 3: 107–24.
34. Comley J. 3D cell culture: easier said than done! *Drug Discovery World* 2010; summer: 25–41.
35. Takagi A., Watanabe M., Ishii Y. et al. Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features. *Anticancer Res.* 2007; 27(1A): 45–53.
36. Hedlund T.E., Duke R.C., Miller G.J. Three-dimensional spheroid cultures of human prostate cancer cell lines. *Prostate* 1999; 41(3): 154–65.
37. Mayer B., Klement G., Kaneko M. et al. Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* 2001; 121(4): 839–52.
38. Feder-Mengus C., Ghosh S., Reschner A. et al. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? *Trends Mol. Med.* 2008; 14(8): 333–40.
39. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* 2008; 3(9-10): 1172–84.
40. Saburina I., Repin V. 3D-culturing: from individual cells to blastemic tissue [Revisited the phenomenon of epithelial-mesenchymal plasticity]. *Cell transplantology and tissue engineering* 2010; 5(2): 75–86.
41. Nederman T., Norling B., Glimelius B. et al. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1984; 44(7): 3090–7.
42. Russell P., Jackson P., Kingsley E. Prostate cancer methods and protocols. *Randwick Humana Press*. 2003; 71–81.
43. 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. *J. Biomol. Screen.* 2004; 9(4): 273–85.
44. Gurski L., Petrelli N., Jia X., Farach-Carson M. 3D Matrices for anti-cancer drug testing and development. *Oncology Issues* 2010; 25: 20–5.
45. Marusic M., Bajzer Z., Freyer J.P. et al. Analysis of growth of multicellular tumour spheroids by mathematical models. *Cell Prolif.* 1994; 27(2): 73–94.
46. Kim J.B., Stein R., O'Hare M.J. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer – a review. *Breast Cancer Res. Treat.* 2004; 85(3): 281–91.
47. Tung Y.C., Hsiao A.Y., Allen S.G. et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 2011; 136(3): 473–8.
48. Hsiao A.Y., 3D spheroid culture systems for metastatic prostate cancer dormancy studies and anti-cancer therapeutics development, in *The University of Michigan*. 2011, The University of Michigan: Ann Arbor. p. 171.
49. Pampaloni F., Stelzer E. Three-dimensional cell cultures in toxicology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2010; 26: 117–38.
50. Hlatky L., Alpen E.L. Two-dimensional diffusion limited system for cell growth. *Cell Tissue Kinet.* 1985; 18(6): 597–611.
51. Li L., Lu Y. Optimizing a 3D culture system to study the interaction between epithelial breast cancer and its surrounding fibroblasts. *Cancer* 2011; 2: 458–66.
52. Olumi A.F., Dazin P., Tlsty T.D. A novel coculture technique demonstrates that normal human prostatic fibroblasts contribute to tumor formation of LNCaP cells by retarding cell death. *Cancer Res.* 1998; 58(20): 4525–30.
53. Vaira V., Fedele G., Pyne S. et al. Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *PNAS USA* 2010; 107(18): 8352–6.
54. Jarvelainen H., Sainio A., Koulu M. et al. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 2009; 61(2): 198–223.

55. Tibbitt M.W., Anseth K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2009; 103(4): 655–63.
56. Prestwich G.D., Liu Y., Yu B. et al. 3-D culture in synthetic extracellular matrices: new tissue models for drug toxicology and cancer drug discovery. *Adv. Enzyme Regul.* 2007; 47: 196–207.
57. Shu X.Z., Ahmad S., Liu Y. et al. Synthesis and evaluation of injectable, in situ crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006; 79(4): 902–12.
58. Jabbari E. Biologically-responsive hybrid biomaterials: a reference for material scientists and bioengineers, A. Khademhosseini editor. Columbia, South Carolina: World Scientific Publishing Co. 2010; 323–7.
59. Huang C.P., Lu J., Seon H. et al. Engineering microscale cellular niches for three-dimensional multicellular co-cultures. *Lab Chip.* 2009; 9(12): 1740–8.
60. Cowan D.S., Hicks K.O., Wilson W.R. Multicellular membranes as an in vitro model for extravascular diffusion in tumours. *Br. J. Cancer Suppl.* 1996; 27: 28–31.
61. Brown J.M., Siim B.G. Hypoxia-specific cytotoxins in cancer therapy. *Semin. Radiat. Oncol.* 1996; 6(1): 22–36.
62. Brown J.M., Giaccia A.J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998; 58(7): 1408–16.
63. Durand R.E., Olive P.L. Evaluation of bioreductive drugs in multicell spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1992; 22(4): 689–92.
64. Hicks K.O., Fleming Y., Siim B.G. et al. Extravascular diffusion of tirapazamine: effect of metabolic consumption assessed using the multicellular layer model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1998; 42(3): 641–9.
65. Schichor C., Kerkau S., Visted T. et al. The brain slice chamber, a novel variation of the Boyden chamber assay, allows time-dependent quantification of glioma invasion into mammalian brain in vitro. *J. Neurooncol.* 2005; 73(1): 9–18.
66. Valster A., Tran N.L., Nakada M. et al. Cell migration and invasion assays. *Methods* 2005; 37(2): 208–15.
67. Oellers P., Schallenberg M., Stupp T. et al. A coculture assay to visualize and monitor interactions between migrating glioma cells and nerve fibers. *Nat. Protoc.* 2009; 4(6): 923–7.

Поступила 20.12.2012