

УДК 576.5 УДК 57.085.23

Практическое применение биотехнологий трехмерного клеточного культивирования в онкологии и персонализированной терапии

© 2020 Е.В. ПЕТЕРСЕН^{1,*}, Д.А. ЧУДАКОВА², Е.Ю. СКОРОВА¹, И.В. РЕШЕТОВ^{1,3}¹Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский Университет), Долгопрудный, Московская область 141701²Биологический факультет, Оклендский Университет, Окленд, Новая Зеландия, 1010³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991

*e-mail: petersen.elena.v@gmail.com

Поступила в редакцию 12.12.2019 г.

После доработки 13.03.2020 г.

Принята к публикации 15.05.2020 г.

Создание клеточных трёхмерных (3D) моделей – перспективное и активно развивающееся направление биотехнологии. В данном обзоре проведен анализ 80 статей, опубликованных не ранее 2008 года и посвященных разработке и апробированию таких моделей в трансляционной онкологии. Приведено описание различных типов клеточных 3D культур, в том числе содержащих и не содержащих внеклеточный матрикс (ВКМ). Особое внимание уделено моделям на основе децеллюляризованного ВКМ (дВКМ). Рассмотрена роль ВКМ в патогенезе злокачественных новообразований, в частности в феномене устойчивости опухоли к химиотерапии. Проведен сравнительный анализ клеточных двумерных (2D) и 3D моделей, описаны природные и синтетические ВКМ, а также создание 3D клеточных культур с использованием 3D биопечати. Подробно описаны результаты моделирования *in vitro* различного рода злокачественных опухолей, в том числе метастатических, с использованием 3D клеточных систем, максимально отражающих поведение опухоли *in vivo*. Обсуждены перспективы использования 3D клеточных моделей в персонализированной терапии злокачественных опухолей и в доклинических скрининговых исследованиях. Приведены данные авторов обзора, полученные при культивировании клеток человека на различных субстратах в формате 3D и 2D.

Ключевые слова: 3D клеточные модели, 3D биопечать, биотехнология, внеклеточный матрикс, злокачественные опухоли, трансляционная медицина, персонализированная медицина, разработка лекарств, *in vitro*, *ex vivo*, онкология.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-3-15

В трансляционной медицине, ориентированной на применение результатов фундаментальных исследований в практическом здравоохранении, необходима разработка экспериментальных *in vitro* моделей, позволяющих наиболее точно воссоздать условия *in vivo*. Особенно актуальны такие модели в онкологии. Разнообразие злокачествен-

ных новообразований, а также их постоянная эволюция, приводящая к резистентности опухолей к терапии, диктует необходимость разработки методов персонализированной диагностики и оценки эффективности проводимого лечения. Наибольший интерес вызывают *in vitro* модели, позволяющие в ходе скринингового наблюдения

Список сокращений: 2D – двумерный, 3D – трехмерный, ВКМ – внеклеточный матрикс, дВКМ – децеллюляризованный или бесклеточный внеклеточный матрикс, ОМ – опухолевое микроокружение, ФАО – фибробласты, ассоциированные с опухолью, ЭМП – эпителио-мезенхимальный переход, сВКМ – синтетический внеклеточный матрикс, ММП – матриксная металлопротеиназа UACC-893 – линия клеток рака молочной железы, усиленных HER2, BT-20 – линия клеток рака молочной железы, MDA-MB-453 – трижды негативная линия клеток рака груди человека.

получить данные об особенностях протекания патологических процессов у конкретного пациента (направление, известное как персонализированная медицина). Несмотря на то, что определены предиктивные маркеры, позволяющие в некоторых случаях прогнозировать эффект от химиотерапии, далеко не все свойства опухоли можно изучить с помощью классических гистологических или молекулярно-биологических и генетических методов. Анализ клеток биопсии инвазивен и зачастую требует неоднократного забора тканевого материала. В свою очередь, используемая на стадии доклинических испытаний лекарств животная модель, представляющая собой ксенотрансплантацию опухолевых клеток человека в модельный организм, имеет ограничения в переносе полученных экспериментальных данных в клинику, из-за разницы в физиологии модельного животного и человека.

На этапе доклинических испытаний часто применяются клеточные модели – линии опухолевых клеток, выделенных из ткани пациента (в случае адгезивных культур клеток это, как правило, монокультура, выращиваемая на плоскости в 2D формате). Давно известно, что данные, полученные на такой модели, не всегда соответствуют результатам экспериментальных исследований *in vivo* на животных моделях и/или в клинических испытаниях. Для того чтобы терапия была эффективной, она должна принимать во внимание взаимодействие клеток опухоли с опухолевым микроокружением (ОМ) – внеклеточным матриксом (ВКМ) и клетками, инфильтрирующими опухоль (например, иммунными клетками, клетками стромы и т.д.) [1]. Однако, 2D клеточная модель не учитывает ОМ, играющее значительную роль в патогенезе злокачественных новообразований, а ОМ в животных моделях не идентично ОМ человека [2]. В то же время, показано, что культуры клеток, выращиваемые в 3D формате, гистологически схожи с биопсийными препаратами, полученными от пациентов [3]. Характеристики роста клеточной линии в 2D формате и 3D формате могут значительно отличаться [4], и в ряде случаев по сравнению с 2D культурами клетки, культивируемые в 3D формате, более устойчивы к химиотерапии [5], что более верно отражает поведение опухоли *in vivo*. Показано, что профиль экспрессии генов и активированные сигнальные пути также отличаются у клеток, культивируемых в 2D или 3D формате [6]. Поэтому, для более точной оценки ответа опухоли на терапию предлагается использовать клеточные 3D модели опухоли, воссоздающие тканевую архитектуру и характерные для *in vivo* клеточные взаимодействия,

как с другими опухолевыми клетками, так и с иммунными клетками, клетками опухолевой стромы и ВКМ. Внедрение таких клеточных и тканевых биотехнологий в доклинические исследования и клиническую практику, и замещение ими ряда классических методов, таких как модели с использованием животных, обещает существенную экономию времени и средств.

Внеклеточный матрикс злокачественных опухолей

ВКМ – это макромолекулярные структуры, формирующие 3D-матрикс соединительной ткани, с которым взаимодействуют клетки [7]. ВКМ состоит из многих компонентов, которые продуцируются и секретируются в межклеточное пространство несколькими типами клеток, например, фибробластами, которые будучи ассоциированными с опухолью (ФАО), модифицируют ВКМ создавая МО, стимулирующее злокачественный рост опухоли [8]. Основные макромолекулы ВКМ – это коллагены I, III, IV, и V типов, гиалуроновая кислота, эластин, фибронектин и другие [9]. ВКМ присуща гетерогенность – то есть его молекулярный состав различен не только в разных органах или участках органа, но и в злокачественных опухолях, что отражает фенотипическую неоднородность клеток, продуцирующих макромолекулы ВКМ и клеток секретирующих, модифицирующие его ферменты (катепсины, матриксные металлопротеиназы, лизил оксидазы и другие). ВКМ также содержит сигнальные молекулы, например, цитокины, факторы роста и т.д., и они различны в нормальной или опухолевой ткани. Наконец, молекулярный состав и 3D архитектура ВКМ динамично меняются в зависимости от процессов происходящих в организме или в клетках, находящихся в непосредственном контакте с ВКМ [10]. Функции ВКМ разнообразны и не ограничиваются только структурной ролью. Он осуществляет регуляторные и трофические функции, направляет клеточную миграцию, участвует в воспалительном процессе, передаче сигналов от клетки к клетке, создает нишу для стволовых клеток (в том числе стволовых клеток опухоли) и т.д [11, 12]. ВКМ злокачественной опухоли принимает участие в патогенезе заболевания и отличается от ВКМ нормальной ткани по архитектуре и составу, в том числе ферментному [7, 11, 13]. Например, в ряде опухолей повышен уровень матриксных металлопротеиназ [14], или уровень лизил-оксидаз, ферментов, регулирующих эпителиально-мезенхимальный переход клеток (ЭМП), а также осуществляющих ковалентные кросс-сшивки коллагена и эластина ВКМ [15, 16]. Ряд онкогенных мутаций,

например, KrasG12D, влияют на синтез коллагена стромы опухоли [17]. Описано еще множество примеров взаимодействия опухоли и ВКМ, и существует несколько подробных обзоров, посвященных этому вопросу. С точки зрения лечащего врача-онколога, наибольший интерес вызывает способность ВКМ влиять на чувствительность опухоли к терапии. Например, показано, что белки ВКМ определяют резистентность клеток рака молочной железы к доксорубину [18] и клеток рака поджелудочной железы к доксорубину и 5-фторурацилу [19], а терапия дексаметазоном усиливает адгезию клеток опухоли к ВКМ, что в свою очередь приводит к устойчивости опухоли к цисплатину и палитакселу в случае рака яичников [20]. К настоящему времени, опубликовано большое количество подобных исследований, демонстрирующих роль ВКМ и ОМ в резистентности опухоли к терапии. Таким образом, мишенью для терапии должны быть не только клетки опухоли, но и ее микроокружение.

Клеточные 3D модели злокачественных опухолей

Клеточные 3D модели опухолей можно подразделить на 1) содержащие ВКМ, либо свободные от ВКМ; 2) монокультуры, состоящие только из опухолевых клеток, либо культуры, полученные при совместном культивировании опухолевых и других типов клеток; 3) статические без жидкостного потока, либо микрофлюидные, в которых происходит поток биологических жидкостей, и, наконец, 4) основанные на культивировании *ex vivo* ткани биопсии, либо модели, в которых пространственная организация клеток формируется *in vitro* [1, 21]. К 3D моделям, не содержащим ВКМ, относятся сфероиды – многоклеточные агрегаты, которые формируются без адгезии к матриксу [22]. Методы формирования 3D сфероидов подробно описаны в ряде недавних работ [23, 24]. Использование неадгезивных клеточных сфероидов позволяет моделировать гипоксию в центре опухоли, а также в какой-то мере воспроизводит межклеточные взаимодействия, происходящие *in vivo* [25, 26]. Изучение многоклеточных сфероидов (таких как маммосферы, нейросферы), формирующихся в суспензии в результате деления одной клетки, полученной из ткани пациента и помещенной в культуральную среду – это классический метод в онкологии [27]. В недавнем исследовании, сфероидная 3D культура клеток опухоли яичников была использована для прогнозирования ответа опухоли на терапию [3], и результаты, полученные на 3D культуре в большинстве случаев, подтвердились в клинике, т.е. продемонстрировано что этот

метод можно использовать при подборе персонализированной терапии. В то же время, использование таких сфероидов для *in vitro* высокопродуктивного скрининга (high-throughput screening) лекарств затруднено, так как получение большого количества клеточных сфероидов одинакового размера остается технически сложной, хотя и выполнимой задачей [28, 29].

Модель, использующая ВКМ – это более сложная в применении, но и более достоверная клеточная модель злокачественных опухолей. Разработаны 3D модели на основе природных или синтетических (в том числе рекомбинантных) ВКМ, использующие один или несколько его компонентов. Синтетический ВКМ (сВКМ) по ряду характеристик соответствует природному. Например, Матригель, который производится и продается рядом биотехнологических компаний, частично воспроизводит структуру и состав характерный для ВКМ *in vivo* [30]. Созданы сВКМ со способностью к биодegradации, синтетические матрицы с разной степенью жесткости, с различными биоактивными группами, пришитыми к матриксу, и т.д. К сВКМ относят матрицы на основе нецитотоксичных и неиммуногенных рекомбинантных белков, не встречающихся в клетках, которые используются для моделирования опухоли. Рекомбинантные белки можно модифицировать, добавляя к ним фрагменты, присутствующие в ВКМ модельного организма, например, аминокислотные последовательности, которые распознаются клеточными рецепторами. Зачастую один и тот же материал используемый для создания сВКМ может формировать разные типы матрикса с различными физико-техническими характеристиками (гидрогели, волокнистые структуры, пористые матрицы и т.д.). Например, на основе рекомбинантного спидроина (белка паутиной нити, получаемого в лабораторных условиях из дрожжевых клеток-продуцентов) можно формировать пленки или полотно, представляющие собой пористую сетку из наноприбрилл (рис. 1 и 2), или получать гидрогели (рис. 2) [31–34]. Мы показали, что рекомбинантный спидроин формирует ВКМ, обеспечивающий адгезию и пролиферацию клеток *in vitro*, в частности мезенхимальные стволовые клетки человека прикрепляются и растут на матриксах из наноприбрилл спидроина (рис. 2a) и на спидроиновом гидрогеле (рис. 2b).

При этом надо понимать, что спидроины – это белки, не встречающиеся в организме человека, поэтому матрицы на их основе могут быть только минорной моделью, в которую нужно дополнительно добавлять элементы клеточного окружения – лиганды к рецепторам факторов роста, матрикс-ассоциированные везикулы, мРНК и т.д.

Разные типы сВКМ подробно описаны в ряде обзоров [35–38] и применяются для решения задач в трансляционной онкологии. Например, с использованием гелевых матриц на основе полиэтиленгликоля, модифицированного биоактивными пептидами, проводилось изучение ЭМП при аденокарциноме легкого [39]. Еще в одном исследовании, синтетический матрикс на основе полиэтиленгликоль-малеимид гидрогеля с добавлением полипептидов использовали для идентификации белков ВКМ, вызывающих устойчивость рака яичников к химиотерапии [40]. Этот же метод может быть применен для прогнозирования ответа клеток опухоли конкретного пациента на терапию.

Недавно была разработана и апробирована клеточная модель колоректальной карциномы, при которой клеточные линии HCT116, SW620 и DLD1, отличающиеся набором мутаций и происходящие от клеток разных пациентов, культивировали в 3D формате с использованием Матригеля, в присутствии фибробластов и клеток эндотелия, либо как монокультуру, и подвергали воздействию лекарственных препаратов в различных дозах и комбинациях [41]. Для сравнения клетки растили и на плоскости в 2D. Было протестировано три лекарственных препарата, 5-фторурацил, регорафениб и эрлотиниб. Оказалось, что добавление фибробластов к 3D культуре опухолевых клеток делало их менее чувствительными к воздействию лекарственных препаратов. Наиболее значительной была разница в ответе на эрлотиниб у клеток DLD1 в 3D по сравнению с 2D форматом. Самый главный вывод, сделанный в этой работе: разные клеточные линии колоректальной

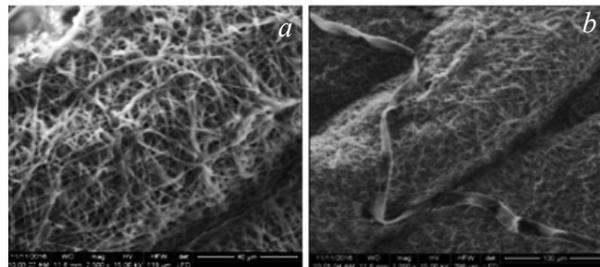


Рис. 1. Нановолокна рекомбинантных спидроинов, полученные электроспиннингом. Электронная микроскопия. Шкала 40 мкм (a) и 100 мкм (b).

Fig. 1. Nanofibrils of recombinant spidroin obtained by electrospinning. Electronic microscopy. Scale bars = 40 μm (a) and 100 μm (b).

карциномы по-разному отвечали в 3D культуре на воздействие лекарственными препаратами. Таким образом, для разработки персонализированной терапии, клетки, полученные из биопсии опухоли пациента, можно культивировать в 3D формате, в том числе в присутствии фибробластов, и проверять ответ клеточной культуры опухоли на разные лекарства, их дозы и комбинации. 3D скаффолд на основе хитозан-альгината был использован для *in vitro* моделирования глиобластомы [42]. Сравнение устойчивости к доксорубицину у клеток в 2D культуре и в составе гетерогенных 3D сфероидов, т.е. сфероидов, состоящих из нескольких типов клеток, было проведено с использованием клеток карциномы печени (клеточная линия HepG2) и фибробластов, инкапсулированных в гель с коллагеном. В соответствии с результатами, ранее полученными на других типах

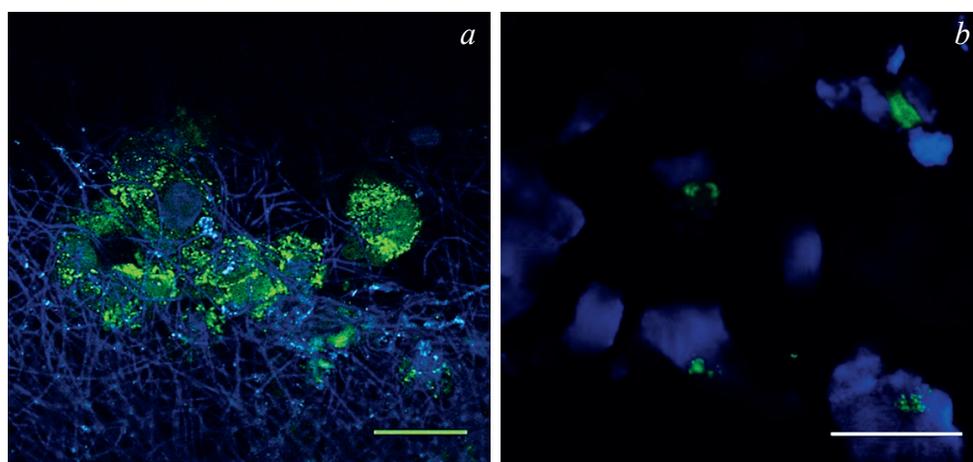


Рис. 2. Клеточная культура мезенхимальных стволовых клеток человека на (a) спидроинового пленках полученных электроспиннингом, спидроин:поликапролактон – 9:1 и (b) на 3% гидрогеле спидроина. Зеленый – кальцеин, голубой – флуоресценция матрикса. Шкала 41 мкм. Конфокальная микроскопия.

Fig. 2. Human mesenchymal stem cells culture on spidroin. (a) – spidroin film obtained by electrospinning, spidroin:polycaprolactone – 9:1. (b) – 3% spidroin hydrogel. Green – calcein, blue – matrix autofluorescence. Scale bar – 41 μm. Confocal microscopy.

злокачественных опухолей, клетки HepG2 культивируемые в формате 3D и в присутствии фибробластов были наиболее устойчивы к доксорубину [43]. Еще в одном исследовании изучали ответ клеток рака груди, полученных из ткани опухоли разных пациентов, на лекарства, используемые для химиотерапии (доксорубин и митоксантрон). Трехмерная культура опухоли была создана с использованием поликапролактонового скаффолда и децеллюляризованного матрикса на основе ФАО. Ответ опухолевых клеток разных пациентов на химиотерапию отличался, то есть этот метод можно использовать для *in vitro* подбора персональной терапии [44].

In vitro моделированию рака груди посвящена еще одна работа, в которой клеточную линию MCF7 (клетки инвазивной аденокарциномы молочной железы) культивировали на трёхмерных коллагеновых скаффолдах. Авторы работы обнаружили, что при таких условиях культивирования в клетках повышается экспрессия факторов роста, стимулирующих ангиогенез, а также уровень ММП. Кроме того, в клеточной культуре появляется суб-популяция клеток с фенотипическими характеристиками стволовых клеток опухоли (экспрессия транскрипционных факторов OCT4A, SOX2, SOX4). Таким образом, эта модель может использоваться для *in vitro* изучения стволовых клеток опухоли [45].

Многокомпонентная модель злокачественной опухоли мозга, глиобластомы, была создана с использованием гидрогеля на основе полиэтиленгликоля, в котором со-культивировали клетки глиобластомы, выделенные из биопсий пациентов, и эндотелиальные клетки мозга мыши. Благодаря инкорпорации в гель волокон альгината, которые подвергаются гидролизу с образованием пор в матриксе, клетки эндотелия формировали в геле структуры, подобные сосудам. Такая модель позволит изучать взаимодействие клеток опухоли и эндотелия [46].

In vitro гистоиды, воспроизводящие гистологические характеристики рака груди, были получены с использованием ко-культур клеточных линий UACC-893, BT-20, и MDA-MB-453, культивируемых вместе с фибробластами, в условиях, в которых клетки постоянно находятся в толще культуральной среды и не опускаются на дно. Это достигается за счет вращения суспензии культуры в биореакторе, обеспечивающей пересечение траекторий движения клеток, что приводит к формированию гетерогенных клеточных трехмерных структур [47]. Клетки линии MCF7, выращенные в 3D формате в гидрогеле на основе гиалуроновой кислоты, отличались от клеток, выращенных

в 2D культуре, более высоким уровнем экспрессии VEGF, IL-8 и bFGF, а также были более инвазивны [48]. Трёхмерная клеточная модель для изучения метастазирования клеток рака простаты в кость была создана с использованием клеток PC-3 (рак простаты) и hOB (человеческие остеобласты). Гетерогенные клеточные сфероиды формировали на сверхгидрофобной подложке, с использованием сфероидных микрогелей на основе гиалуронан-метакрилата и желатин-метакрилата. Клетки, культивируемые в 3D микрогелевом формате, были более устойчивы к цисплатину по сравнению с клетками, культивируемыми в формате многоклеточного сфероида без микрогеля [49].

Мы изучили *in vitro* поведение клеточной линии A549 (аденокарцинома альвеолярного базального эпителия человека) в 3D клеточной модели – сферообразование и миграцию на разных субстратах при ремоделировании ВКМ по структуре коллагена (рис. 3).

Мы обнаружили, что при высевании клеток на различные субстраты происходит изменение скорости и характера миграции, а также изменение морфологии клеток (рис. 3 и 4). Ранее, уже предпринимались попытки культивировать эту клеточную линию в 3D формате для создания трехмерной культуры, моделирующей рак легкого, причем было рекомендовано использование коллагена как ВКМ [50, 51].

3D клеточные культуры злокачественных опухолей на основе децеллюляризованного ВКМ

Весьма точно условия *in vivo* воссоздаются при использовании 3D конструкций на основе децеллюляризованного, то есть бесклеточного, ВКМ (дВКМ). Первые попытки получения дВКМ были предприняты еще в середине двадцатого столетия, и к настоящему времени разработано множество методов децеллюляризации [52]. В ходе этого процесса из ткани или органа удаляется клеточный компонент и нуклеиновые кислоты, но сохраняется ВКМ, его макромолекулярный состав и 3D архитектура, что позволяет воспроизвести *in vitro* такие *in vivo* параметры, как характер инвазивного роста опухоли и ее морфологию (рис. 5). Методов децеллюляризации на данный момент разработано довольно много, и их можно подразделить на физические, химические и энзиматические. Во многих работах дВКМ был использован для моделирования поведения опухоли и ее ответа на терапию. Например, было изучено заселение моноцитами нормального и опухолевого (полученного из ткани карциномы кишечника) дВКМ. В дВКМ, полученном из ткани опухоли,

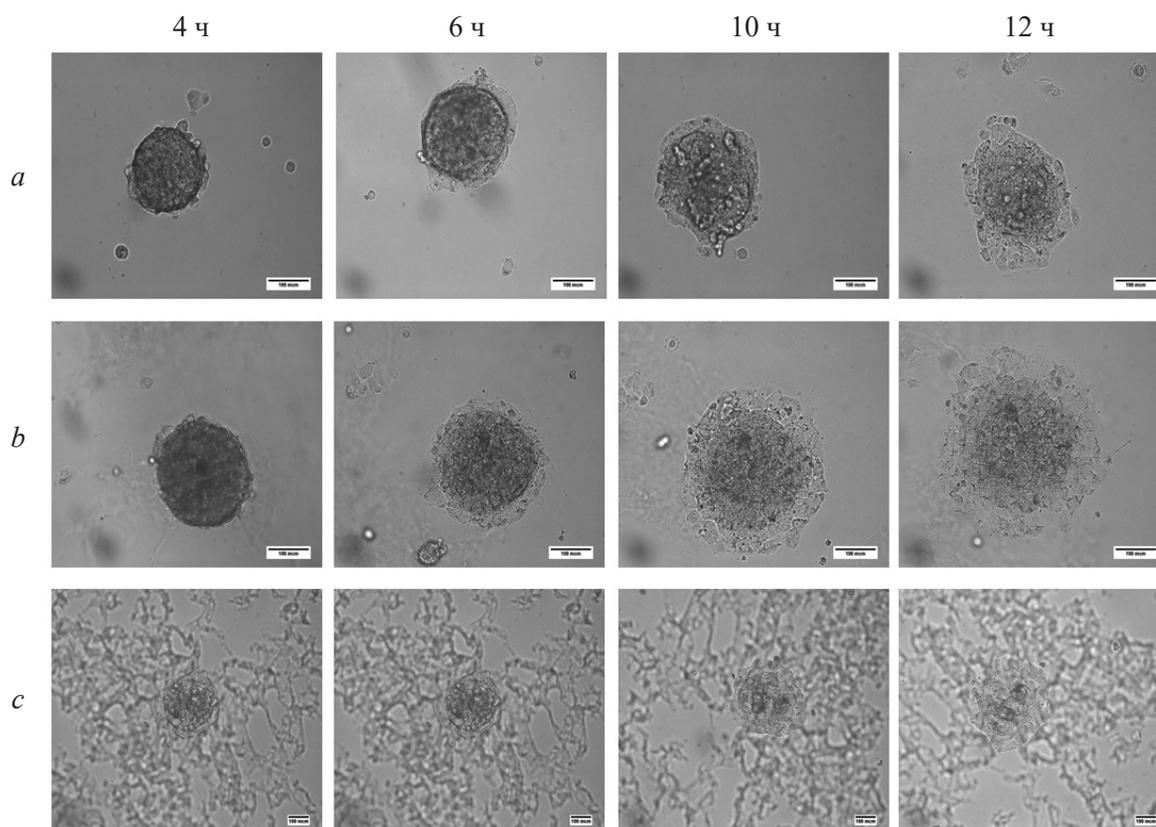


Рис. 3. Сферообразование и миграция клеточной линии A549 в формате 3D культивирования на (a) адгезивном пластике, (b) коллагене и (c) матриксе Cultrex 3D Culture Matrix Rat Collagen I спустя 4, 6, 10 и 12 часов после высевания клеток. Световая микроскопия.

Fig. 3. Sphere-formation and migration of cell line A549 3D culturing on (a) adhesive plastic, (b) collagen and (c) Cultrex 3D Culture Matrix Rat Collagen I at 4, 6, 10 and 12 hours after the seeding. Light microscopy.

CD68⁺ моноциты были локализованы вокруг диспластических и неопластических желез, а в нормальном они были распределены гомогенно, что соответствует распределению моноцитов *in vivo* [53]. Похожий подход использовали при исследовании влияния дВКМ на поляризацию макрофагов. Было обнаружено, что при культивировании

дВКМ из нормальной ткани макрофаги приобретают про-воспалительный фенотип, сопровождающийся увеличением секреции ИЛ-6. Использование матрикса из опухолевой ткани приводит к появлению анти-воспалительного фенотипа, секреции ИЛ-10 и TGF- β и экспрессии CCL18, что способствует опухолевой инвазии [54].

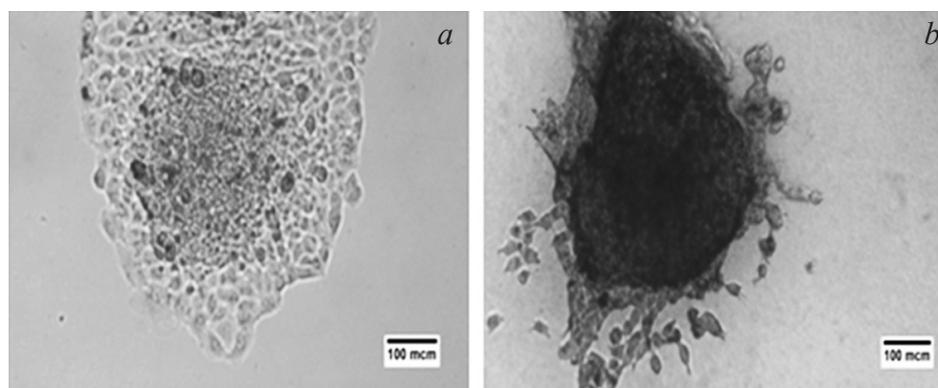


Рис. 4. Миграция клеточной линии A549 в формате 3D культивирования на (a) адгезивном пластике и (b) коллагене, 24 часа после высевания клеток. Световая микроскопия.

Fig. 4. Migration of cell line A549 3D culturing on (a) adhesive plastic and (b) collagen. Light microscopy.

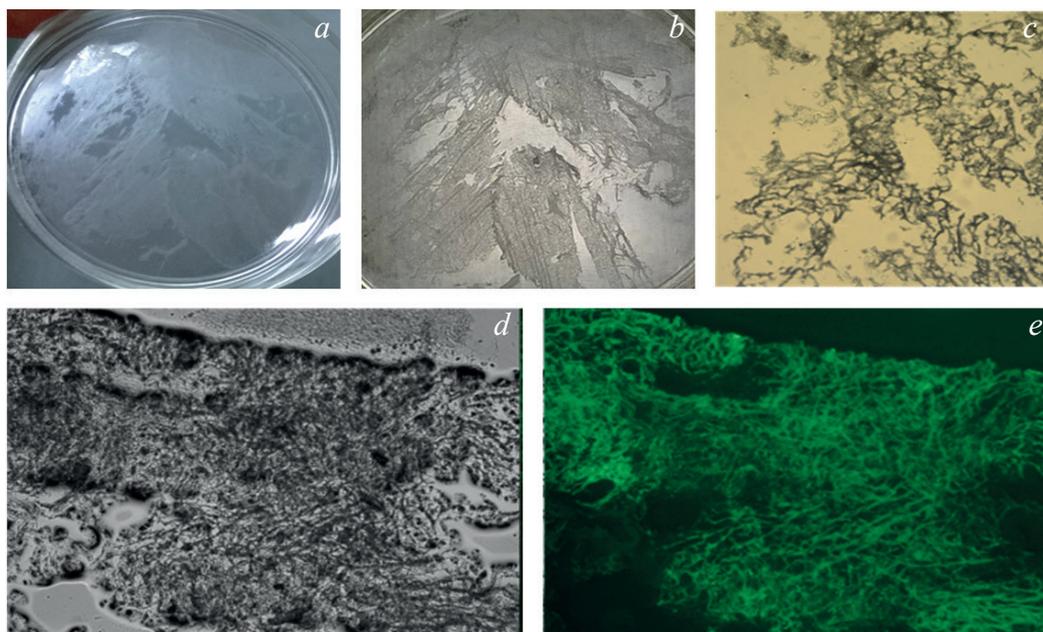


Рис. 5. Чашка Петри с нанесенными срезами матрикса лёгкого толщиной 15 мкм, серия изображений с последовательным увеличением (*a,b,c*). дВКМ ткани легкого в проходящем (*d*) и поляризованном (*e*) свете.

Fig. 5. Cell culture dish with lung tissue slices (thickness 15 μm), several images with increase in magnification (*a,b,c*). Decellularised ECM derived from lung tissue and visualised in transmitted (*d*) and polarized (*e*) light.

При культивировании клеточной линии MCF7 (клетки инвазивной аденокарциномы молочной железы) на дВКМ, полученном из тканей злокачественной опухоли молочной железы, в клетках MCF7 наблюдались признаки ЭМП, способствующего метастазированию *in vivo* [55]. При 3D клеточном моделировании рака полости рта, клеточную линию плоскоклеточного рака головы и шеи UM-SCC-1 культивировали на децеллюляризированной коже, покрытой коллагеном IV типа. Полученный клеточный кластер по характеру инвазивного роста, морфологическим и гистологическим характеристикам был схожим с опухолевыми тканями пациентов [56]. Еще в одном исследовании использовали дВКМ жировой ткани как 3D скаффолд для клеток рака молочной железы, и обнаружили что клетки рака, выращенные на дВКМ были ближе к ксенографтным моделям нежели 2D культуре [57]. Сравнительный анализ показал, что клетки рака мочевого пузыря (клеточные линии RT4, T24, и UM-UC-3) более резистентны к лучевой терапии при выращивании на дВКМ в 3D формате по сравнению с 2D форматом клеточной культуры [58]. В еще одной работе, ткань биопсии злокачественной опухоли груди была децеллюляризована и использована для культивирования клеточной линии MCF7. Культивирование на дВКМ стимулировало ЭМП в популяции полученных клеток, и приводило к увеличению экспрессии маркеров, свойственных ство-

ловым клеткам опухоли, таких как Oct4 и Sox2. Кроме того, клетки MCF7, культивируемые на дВКМ, были более устойчивы к 5-фторурацилу, нежели клетки, которые росли в монослое [59].

Еще одна модель рака молочной железы была создана для изучения колонизации лёгочной ткани метастатическими клетками этой опухоли. дВКМ тканей мышинного легкого заселяли клетками линий MCF7 (не метастатические клетки) и MDA-MB-231 и 4T1 (метастатические клетки). Используемые метастатические клетки колонизировали дВКМ ткани лёгкого, в то время как большинство MCF7 не выжили на этом матриксе. Нокдаун ZEB1, одного из положительных регуляторов ЭМП, участвующего в процессах метастазирования, приводил к снижению инвазии дВКМ лёгкого клетками MDA-MB-231. Это подтверждает важную роль ЭМП в метастазировании рака груди в лёгочную ткань [60].

Мы изучили поведение клеток карциномы лёгкого MCF7 на различных дВКМ (рис. 6 и 7).

В экспериментах с использованием ВКМ на основе нормальной и опухолевой (карцинома Льюиса) тканей лёгкого мы обнаружили, что они обладают различной тропностью для опухолевых клеток. В случае дВКМ карциномы Льюиса, высаженные на матрикс опухолевые клетки, прикреплялись преимущественно на пластик вне матрикса, а клетки, которые оказывались на матриксе, погибали от апоптоза (микроскопия выявляла

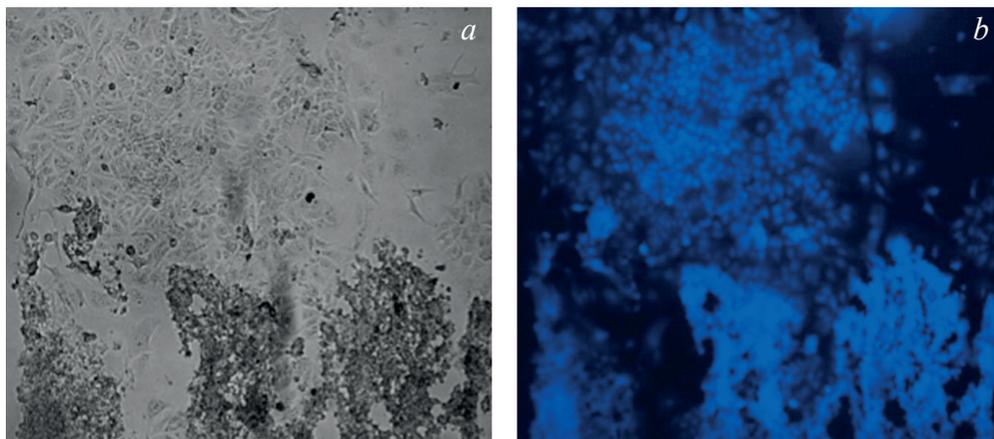


Рис. 6. Выращивание клеток MCF7 на дВКМ опухолевой легочной ткани (карцинома Льюиса). Световая микроскопия (a) и флуоресцентная микроскопия (окраска синим – клеточные ядра, аутофлуоресценция дВКМ) (b).

Figure 6. Cell line MCF7 cultured on decellularised ECM derived from Lewis lung carcinoma. Light microscopy (a) and fluorescent microscopy (b). Blue – cell nucleus staining and autofluorescence of the matrix.

образование множества апоптотных телец) (рис. 6). Мы не исключаем, что это может быть артефактом, связанным с методом обработки ткани для получения дВКМ, и поэтому необходима дальнейшая разработка и сравнение разных протоколов децеллюляризации. Ранее сообщалось, что дВКМ, как приготовленные с использованием стандартных протоколов, так и купленные у компании-производителя, могут приводить к гибели ряда клеток [61]. Предполагается, что дВКМ содержит некие растворимые факторы, вызывающие такой клеточный ответ. В случае дВКМ нормальной легочной ткани гибель клеток MCF7 при заселении матрикса не наблюдалась, и через несколько дней после заселения они образовывали плотные агрегаты на поверхности матрикса (рис. 7).

В настоящее время, модели на основе дВКМ считаются одними из самых перспективных для изучения микроокружения опухоли.

3D биопечать

Заслуживает упоминания так же 3D биопечать, то есть создание трехмерных клеточных культур, органоидов или органов методом «печати» с использованием био-принтера (принтера, в котором в качестве чернил используются составы образующие ВКМ/скаффолд и содержащие клетки и ростовую среду). 3D биопечать используется уже почти 20 лет с конца 1990 – начала 2000 годов [62]. В настоящее время используются два подхода: биопечать матрицы ВКМ с последующим заселением клетками, либо заселение матрицы клетками

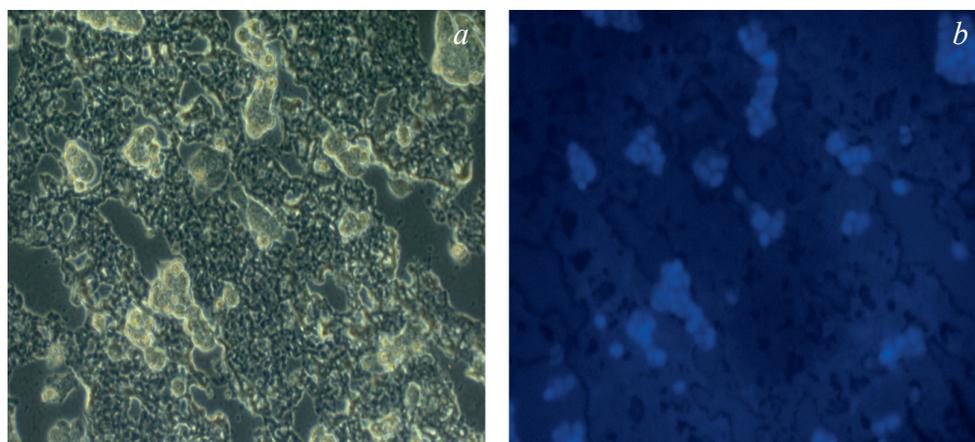


Рис. 7. Выращивание клеток MCF7 на дВКМ нормальной легочной ткани. Световая микроскопия (a) и флуоресцентная микроскопия (окраска синим – клеточные ядра, аутофлуоресценция дВКМ) (b).

Fig. 7. Cell line MCF7 cultured on decellularised ECM derived from non-tumorous lung tissue. Light microscopy (a) and fluorescent microscopy (b). Blue – cell nucleus staining and autofluorescence of the matrix.

непосредственно в ходе печати. Основные методы 3D биопечати, а также модели злокачественных опухолей, созданные с использованием биопринтинга подробно описаны в ряде обзоров [63–65].

Органоиды на основе клеток злокачественных опухолей

Еще одна *in vitro* 3D модель злокачественного новообразования это органоиды, созданные из опухолевых клеток пациента или фрагментов опухолевой ткани и воспроизводящие гистологическую и генетическую гетерогенность опухоли. Было показано, что в ряде случаев органоиды можно создать из очень маленького фрагмента опухоли, например, полученного методом игольной биопсии, как было продемонстрировано на опухолях поджелудочной железы [66] и печени [67]. В настоящее время, органоиды формируют как на основе клеток первичной опухоли, так и из метастатических клеток. В ретроспективном исследовании на группе пациентов со злокачественными новообразованиями поджелудочной железы, органоиды, полученные из клеток опухоли, отвечали на химиотерапию так же, как и опухоль пациента в ходе химиотерапии [68], то есть было продемонстрировано, что органоиды можно использовать для прогнозирования ответа на терапию. Так, например, ответ *in vitro* культуры органоидов на анти-EGFR терапию совпадал с *in vivo* ответом на эту терапию в группе пациентов с метастазами злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта [69]. Важно отметить, что оценка ответа опухоли на химиотерапию, полученная на культуре органоидов, дополняет (а зачастую и корректирует) фармакогенетический прогноз, полученный генотипированием биопсии. Так, например, в исследовании на группе больных с карциномой яичников, для некоторых пациентов генотипирование указывало на возможную чувствительность к ингибиторам PARP, что не подтвердилось при проверке на культуре органоидов [70]. Ответ опухоли на химиотерапию траметинибом (ингибитор MEK), gefitinибом (ингибитор EGFR) и эверолимусом (ингибитор mTOR) был также спрогнозирован в исследовании на культуре органоидов, полученных из опухолевых тканей глиобластомы пациентов [71]. При выборе химиотерапии руководствовались молекулярными характеристиками опухоли, такими как профиль экспрессии генов или спектр мутаций. Было показано, что ответ *in vitro* 3D культуры на химиотерапию совпадает с поведением опухоли пациента *in vivo* [71]. Сходство ткани опухоли и полученных из нее органоидов было также продемонстрировано в исследовании на группе пациентов с холангиокарциномой, а

проведенный на этих культурах органоидов скрининг лекарственных средств идентифицировал несколько кандидатов для использования в терапии [72]. Кроме того, созданы и апробированы в качестве *in vitro* системы для подбора персонализированной химиотерапии органоиды на основе тканей ряда других видов злокачественных опухолей, например, опухолей головы и шеи [73], колоректального рака [74]. Наконец, при подборе персонализированной терапии также используют *ex vivo* образцы опухолевой ткани (так называемые опухолевые экспланты), которые непосредственно после резекции тканей опухоли в ходе операции или забора биопсии культивируют и обрабатывают различными препаратами химиотерапии. При таком подходе сохраняется 3D архитектура, присутствующая опухолевой ткани *in vivo*, ее гистологические характеристики и внутриопухолевая клеточная гетерогенность. Пример такого подхода – недавняя работа, в ходе которой при почечно-клеточной карциноме была оценена чувствительность культуры срезов опухолевой ткани к действию различных ингибиторов тирозинкиназ – сунитиниба, пазопаниба и темсиролимуса [75]. Перспективы использования органоидов в персонализированной терапии, разработке лекарств и доклиническом моделировании злокачественных новообразований подробно обсуждаются в ряде обзоров [76, 77].

Заключение

В современной клеточной биологии, 3D модели приходят на смену 2D моделям, так как трехмерная многокомпонентная *in vitro* модель более точно воспроизводит процессы, происходящие *in vivo*. Важно отметить, что при всех очевидных достоинствах трехмерных моделей, у них есть несколько недостатков. По сравнению с 2D моделью, 3D модель априори более сложная, что, с одной стороны, позволяет более точно воспроизвести процессы, происходящие *in vivo*, но, с другой стороны, затрудняет применение этого метода в скрининговых исследованиях, где необходима стандартизация метода, позволяющая многократно повторять эксперимент. Протоколы для 3D культур, как правило, разрабатываются в лаборатории для конкретного проекта и в отличие от 2D культур не стандартизированы, что осложняет сравнение результатов, полученных в разных лабораториях. Кроме того, фибриллярные белки ВКМ имеют высокий уровень автофлуоресценции [78]. Это затрудняет визуализацию клеток на матриксе с использованием флуоресцентных меток. Более того, некоторые методы микроскопии применимы при работе с 2D, но не 3D культурами клеток [79]. Клетки, выращиваемые на

матрикс, как правило, образуют компактные кластеры, а сами клетки принимают форму полусферы, что также затрудняет скрининг, основанный на оценке морфологии клеток. Наконец, анализ клеток, находящихся внутри скаффолда затруднен и в ряде случаев невозможен без нарушения его трехмерной структуры [80]. Тем не менее, при условии стандартизации и оптимизации протоколов, описанные подходы в моделировании опухолевого развития могут быть перенесены в клиническую практику, где 3D клеточная модель будет создаваться с использованием первичных культур клеток, полученных от пациента. Такая модель, которая во многом отражает процесс развития опухоли в условиях *in vivo*, позволит как прогнозировать ход течения заболевания, так и проводить оценку эффективности выбранной терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Шабалиной Е. за часть полученных экспериментальных данных, а также ООО «ОКА-Биотех» за предоставленные образцы рекомбинантного спидроина

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ No. 18-15-00391.

ЛИТЕРАТУРА

- Roma-Rodrigues C., Mendes R., Baptista P.V., et al. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 840–871. doi: 10.3390/ijms20040840
- Mak I.W., Evaniew N., Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am. J. Transl. Res.* 2014, 6, 114–118.
- Shuford S., Wilhelm C., Rayner M., et al. Prospective Validation of an Ex Vivo, Patient-Derived 3D Spheroid Model for Response Predictions in Newly Diagnosed Ovarian Cancer. *Sci. Rep.* 2019, 9, 11153–11166. doi: 10.1038/s41598-019-47578-7
- Leslie K., Gao S.P., Berishaj M., et al. Differential interleukin-6/Stat3 signaling as a function of cellular context mediates Ras-induced transformation. *Breast Cancer Research.* 2010, 12(5), R80. doi: 10.1186/bcr2725.
- Stankevicius V., Vasauskas G., Noreikiene R., et al. Extracellular Matrix-dependent Pathways in Colorectal Cancer Cell Lines Reveal Potential Targets for Anticancer Therapies. *Anticancer. Res.* 2016, 36(9), 4559–4567. doi: 10.21873/anticancer.11004
- Melissaridou S., Wiechec E., Magan M., et al. The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int.* 2019, 19, 16. doi: 10.1186/s12935-019-0733-1
- Seewaldt V. ECM stiffness paves the way for tumor cells. *Nat. Med.* 2014, 20 (4). doi: 10.1038/nm.3523
- Alkasalias T., Moyano-Galceran L., Arsenian-Henriksson M., et al. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(5). doi: 10.3390/ijms19051532
- Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., et al. Extracellular matrix structure. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2016, 97, 4–27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001
- Walker C., Mojares E. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. del Río Hernandez. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(10). doi: 10.3390/ijms19103028
- Nallanthighal S., Heiserman J.P., Cheon D.-J. The Role of the Extracellular Matrix in Cancer. *Front. Cell. Dev. Biol.* 2019, 7. doi: 10.3389/fcell.2019.00086
- Boyd D.F., Thomas P.G. Towards integrating extracellular matrix and immunological pathways. *Cytokine.* 2017, 98, 79–86. doi: 10.1016/j.cyto.2017.03.03.00
- Filipe E.C., Chitty J.L., Cox T.R. Charting the unexplored extracellular matrix in cancer. *Int. J. Exp. Pathol.* 2018, 99(2), 58–76. doi: 10.1111/iep.12269
- Merchant N., Nagaraju G.P. Rajitha B., et al. Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer. *Carcinogenesis.* 2017, 38(8), 766–780. doi: 10.1093/carcin/bgx063
- Kasashima H., Yashiro M., Kinoshita H., et al. Lysyl oxidase is associated with the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells in hypoxia. *Gastric. Cancer.* 2016, 19 (2), 431–442. doi: 10.1007/s10120-015-0510-3
- Barker H.E., Cox T.R., Erler J.T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2012, 12 (8), 540–52. doi: 10.1038/nrc3319
- Shields M.A., Ebine K., Sahai V., et al. Snail Cooperates with KrasG12D to Promote Pancreatic Fibrosis. *Mol. Cancer. Res.* 2013, 11(9), 1078–87. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0637
- Lovitt C.J., Shelper T.B., Avery V.M. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer.* 2018, 18(1). doi: 10.1186/s12885-017-3953-6
- Miyamoto H., Murakami T., Tsuchida K., et al. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas.* 2004, 28(1), 38–44. doi: 10.1097/00006676-200401000-00006
- Chen Y.-X., Wang Y., Fu C.-C., et al. Dexamethasone enhances cell resistance to chemotherapy by increasing adhesion to extracellular matrix in human ovarian cancer cells. *Endocrine-Related Cancer.* 2010, 17(1), 39–50. doi: 10.1677/ERC-08-0296
- Nunes A.S., Barros A.S., Costa E.C., et al. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Correia. Biotechnol. Bioeng.* 2019, 116 (1), 206–226. doi: 10.1002/bit.26845

22. Nath S., Devi G.R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol. Ther.* 2016, 163, 94–108. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013
23. Bregenzer M.E., Horst E.N., Mehta P., et al. Integrated cancer tissue engineering models for precision medicine. *PLOS ONE*. 2019, 14(5). doi: 10.1371/journal.pone.0216564
24. Foty R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *Journal of Visualized Experiments*. 2011, 51. doi: 10.3791/2720
25. Riffle S., Hegde R.S. Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2017, 36 (1), 102. doi: 10.1186/s13046-017-0570-9
26. Tzedakis G., Liapis E., Tzamali E., et al. A hybrid discrete-continuous model of in vitro spheroid tumor growth and drug response. *Conf. Proc. IEEE. Eng. Med. Biol. Soc.* 2016, 2016, 6142–6145. doi: 10.1109/EMBC.2016.7592130
27. Weiswald L-B., Bellet D., Dangles-Marie V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*. 2015, 17(1), 1–15. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004
28. Sant S., Johnston P.A. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov. Today Technol.* 2017, 23, 27–36. doi: 10.1016/j.ddtec.2017.03.03.002
29. Hagemann J., Jacobi C., Gstoettner S., et al. Therapy Testing in a Spheroid-based 3D Cell Culture Model for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Vis. Exp.* 2018, 134. doi: 10.3791/57012
30. Benton G., Arnaoutova I., George J., et al. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014, 79–80, 3–18. doi: 10.1016/j.addr.2014.06.005
31. Малюгин Б.Э., Борзенко С. А., Сабурина И. Н., и др. Разработка биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе пленочного матрикса из спидроина и культивированных клеток лимбальной зоны глазного яблока. *Офтальмохирургия*. 2013, 4, 89–97.
32. Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., et al. Tissue regeneration *in vivo* within recombinant spidroin 1 scaffolds. *Biomaterials*. 2012, 33(15), 3887–98. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.013
33. Богуш В.Г., Давыдова Л.И., Мойсенович М.М., и др. Характеристика биodeградируемых клеточных микро и макроносителей на основе рекомбинантного спидроина. *Биотехнология*. 2014, 30, 52–61.
34. Nosenko M.A., Moisenovich A.M., Zvartsev R.V., et al. Novel Biodegradable Polymeric Microparticles Facilitate Scarless Wound Healing by Promoting Re-epithelialization and Inhibiting Fibrosis. *Front. Immunol.* 2018, 9, 2851. doi: 10.3389/fimmu.2018.02851
35. Kyburz K.A., Anseth K.S. Synthetic Mimics of the Extracellular Matrix: How Simple is Complex Enough? *Ann. Biomed. Eng.* 2015, 3(3), 489–500. doi: 10.1007/s10439-015-1297-4
36. Huang G., Li F., Zhao X., et al. Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three Dimensional Cell Microenvironment. *Chem. Rev.* 2017, 117(20), 12764–12850. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00094
37. Rijal G., Li W. Native-mimicking in vitro microenvironment: an elusive and seductive future for tumor modeling and tissue engineering. *J. Biol. Eng.* 2018, 12. doi: 10.1186/s13036-018-0114-7
38. Liaw C-Y., Ji S., Guvendiren M. Engineering 3D Hydrogels for Personalized In Vitro Human Tissue Models. *Adv. Healthc. Mater.* 2018, 7(4). doi: 10.1002/adhm.201701165
39. Gill B.J., Gibbons D.L., Roudsari L.C., et al. A synthetic matrix with independently tunable biochemistry and mechanical properties to study epithelial morphogenesis and EMT in a lung adenocarcinoma model. *Cancer Res.* 2012, 72(22), 6013–23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0895
40. Brooks E.A., Gencoglu M.F., Corbett D.C., et al. An omentum-inspired 3D PEG hydrogel for identifying ECM-drivers of drug resistant ovarian cancer. *APL Bioengineering*. 2019, 3(2), 026106. doi: 10.1063/1.5091713
41. Zoetemelk M., Rausch M., Colin D.J., et al. Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Sci. Rep.* 2019, 9(1), 7103. doi: 10.1038/s41598-019-42836-0
42. Kievit F.M., Florczyk S.J., Leung M.C., et al. Chitosan-alginate 3D scaffolds as a mimic of the glioma tumor microenvironment. *Biomaterials*. 2010, 31(22), 5903–10. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.062
43. Yip D., Cho C.H. A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 433(3), 327–32. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.008
44. Nayak B., Balachander G.M., Manjunath S., et al. Tissue mimetic 3D scaffold for breast tumor-derived organoid culture toward personalized chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019, 180, 334–343. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.04.056
45. Chen L., Xiao Z., Meng Y., et al. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials*. 2012, 33(5), 1437–44. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.056
46. Wang C., Li J., Sinha S., et al. Mimicking brain tumor-vasculature microanatomical architecture via co-culture of brain tumor and endothelial cells in 3D. *Biomaterials*. 2019, 202, 35–44. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.02.024
47. Kaur P., Ward B., Saha B., et al. Human breast cancer histoid: an in vitro 3-dimensional co-culture model that mimics breast cancer tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 2011, 59(12), 1087–100. doi: 10.1369/0022155411423680
48. Suo A., Xu W., Wang Y., et al. Dual-degradable and injectable hyaluronic acid hydrogel mimicking extracellular matrix for 3D culture of breast cancer MCF-7. *Carbohydr. Polym.* 2019, 211, 336–348. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.01.115

49. Antunes J., Gaspar V.M., Ferreira L., et al. In-air production of 3D co-culture tumor spheroid hydrogels for expedited drug screening. *Acta. Biomater.* 2019, 94, 392–409. doi: 10.1016/j.actbio.2019.06.012
50. Zuchowska A., Jastrzebska E., Zukowski K., et al. A549 and MRC-5 cell aggregation in a microfluidic Lab-on-a-chip system. *Biomicrofluidics.* 2017, 11(2), 024110. doi: 10.1063/1.4979104
51. Lu S., Zhao F., Zhang Q., et al. Therapeutic Peptide Amphiphile as a Drug Carrier with ATP-Triggered Release for Synergistic Effect, Improved Therapeutic Index, and Penetration of 3D Cancer Cell Spheroids. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(9). doi: 10.3390/ijms19092773
52. Hinderer, S. ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy / S. Hinderer, S.L. Layland, K. Schenke-Layland. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2016, 97, 260–9. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.019
53. Genovese L., Zawada L., Tosoni A., et al. Cellular Localization, Invasion, and Turnover Are Differently Influenced by Healthy and Tumor-Derived Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part A.* 2014, 20(13–14), 2005–18. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0588
54. Pinto M.L., Rios E., Silva A.C., et al. Decellularized human colorectal cancer matrices polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype promoting cancer cell invasion via CCL18. *Biomaterials.* 2017, 124, 211–224. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.004
55. Jin Q., Liu G., Li S., et al. Decellularized breast matrix as bioactive microenvironment for in vitro three-dimensional cancer culture. *Journal of Cellular Physiology.* 2019, 234(4), 3425–3435. doi: 10.1002/jcp.26782
56. Scanlon C.S., Van Tubergen E.A., Chen L.-C., et al. Characterization of squamous cell carcinoma in an organotypic culture via subsurface non-linear optical molecular imaging. *Exp. Biol. Med. [Maywood].* 2013, 238(11), 1233–41. doi: 10.1177/1535370213502628
57. Dunne L.W., Huang Z., Meng W., et al. Human decellularized adipose tissue scaffold as a model for breast cancer cell growth and drug treatments. *Biomaterials.* 2014, 35(18), 4940–9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.003
58. Bodgi L., Bahmad H.F., Araj T., et al. Assessing Radiosensitivity of Bladder Cancer in vitro: A 2D vs. 3D Approach. *Front. Oncol.* 2019, 9, 153. doi: 10.3389/fonc.2019.00153
59. Liu G., Wang B., Li S., et al. Human breast cancer decellularized scaffolds promote epithelial-to-mesenchymal transitions and stemness of breast cancer cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* 2019, 234(6), 9447–9456. doi: 10.1002/jcp.27630
60. Xiong G., Flynn T.J., Chen J., et al. Development of an ex vivo breast cancer lung colonization model utilizing a decellularized lung matrix. *Integr. Biol. (Camb).* 2015, 7(12), 1518–25. doi: 10.1039/c5ib00157a
61. Morris A.H., Chang J., Kyriakides T.R. Inadequate Processing of Decellularized Dermal Matrix Reduces Cell Viability In Vitro and Increases Apoptosis and Acute Inflammation In Vivo. *BioResearch Open Access.* 2016, 5(1), 177–87. doi: 10.1089/biores.2016.0021
62. Chiu D.T., Jeon N.J., Huang S., et al. Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *PNAS.* 2000, 97(6), 2408–13. doi: 10.1073/pnas.040562297
63. Ma X., Liu J., Zhu W., et al. 3D bioprinting of functional tissue models for personalized drug screening and in vitro disease modeling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018, 132, 235–251. doi: 10.1016/j.addr.2018.06.011
64. Dzobo K., Motaung K.S.C.M., Adesida A. Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019, 20(18), 4628. doi: 10.3390/ijms20184628
65. Liu T., Delavaux C., Zhang Y.S. 3D bioprinting for oncology applications. *Journal of 3D Printing in Medicine.* 2019, 3, 55–58. doi: 10.2217/3dp-2019-0004
66. Tiriach H., Bucobo J.C., Tzimas D., et al. Successful creation of pancreatic cancer organoids by means of EUS-guided fine-needle biopsy sampling for personalized cancer treatment. *Gastrointest. Endosc.* 2018, 87(6), 1474–1480. doi: 10.1016/j.gie.2017.12.032
67. Nuciforo S., Fofana I., Matter M.S., et al. Organoid Models of Human Liver Cancers Derived from Tumor Needle Biopsies. *Cell Rep.* 2018, 24(5), 1363–1376. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.001
68. Tiriach H., Belleau P., Engle D.D., et al. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 2018, 8(9), 1112–1129. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0349
69. Vlachogiannis G., Hedayat S., Vatsiou A., et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal. *Science.* 2018, 359(6378), 920–926. doi: 10.1126/science.aao2774
70. Hill S.J., Decker B., Roberts E.A., et al. Prediction of DNA Repair Inhibitor Response in Short-Term Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids. *Cancer Discov.* 2018, 8(11), 1404–1421. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0474
71. Fadi J., Salinas R.D., Zhang, D.Y. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell.* 2020, 180(1), 188–204.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.036
72. Saito Y., Muramatsu T., Kanai Y., et al. Establishment of patient-derived organoids and drug screening for biliary tract carcinoma. *Cell Rep.* 2019, 27(4), 1265–1276.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.088
73. Tanaka N., Osman A.A., Takahashi Y., et al. Head and neck cancer organoids established by modification of the CTOS method can be used to predict in vivo drug sensitivity. *Oral Oncol.* 2018, 87, 49–57. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.10.018

74. Yao Y., Xu X., Yang L., et al. Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell*. 2020, 26(1), 17–26. doi: 10.1016/j.stem.2019.10.010
75. Roelants C., Pillet C., Franquet Q., et al. Ex-Vivo Treatment of Tumor Tissue Slices as a Predictive Preclinical Method to Evaluate Targeted Therapies for Patients with Renal Carcinoma. *Cancers*. 2020, 12(1), E232. doi: 10.3390/Cancers12010232
76. Nagle P.W., Plukker J.T.M., Muijs C.T., et al. Patient-derived Tumor Organoids for Prediction of Cancer Treatment. *Semin Cancer Biol*. 2018, 53, 258–264. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.06.005
77. Weeber F., Ooft S.N., Dijkstra K.K., et al. Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chem Biol*. 2017, 24(9), 1092–1100. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.06.012
78. Pavlova I., Williams M., El-Naggar A., et al. Understanding the Biological Basis of Autofluorescence Imaging for Oral Cancer Detection: High-Resolution Fluorescence Microscopy in Viable Tissue. *Clin Cancer Res*. 2008, 14(8), 2396–404. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1609
79. Charwata V., Schütze K., Holthoner W., et al. Potential and limitations of microscopy and Raman spectroscopy for live-cell analysis of 3D cell cultures. *Journal of Biotechnology*. 2015, 205, 70–81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.02.007
80. Antoni D., Burckel H., Josset E., et al. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int. J. Mol. Sci*. 2015, 16(3), 5517–27. doi: 10.3390/ijms16035517

Practical Applications of 3D Cell Culture Biotechnologies for Translational Oncology and Personalized Therapy

E.V. PETERSEN^{1,*}, D.A. CHUDAKOVA², E.Yu. SKOROVA¹, and I.V. RESHETOV^{1,3}

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Oblast, 141701 Russia

²School of Biological Sciences, University of Auckland, Auckland, New Zealand, 1010

³L.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: petersen.elena.v@gmail.com

Received December.12, 2019

Revised March13, 2020

Accepted May 15, 2020

Abstract—The creation of *in vitro* three-dimensional cellular model systems (in vitro 3D cultures) is a fast-growing leading-edge segment of the biotechnological industry. We have examined in this work the key 80 articles published after 2008, and focused on applications of in vitro 3D culture in translational oncology. We described a broad range of 3D culture systems, including models with and without extracellular matrix (ECM). 3D culture models based on decellularized ECM were discussed in more detail. The role of ECM in pathogenesis of malignant neoplasms, in particular, in the phenomenon of the tumor resistance to chemotherapy, was evaluated. 2D and 3D culture systems were compared, and natural and synthetic ECM were described, as well as the model creation based on 3D bioprinting. Particular attention was paid to *in vitro* models of various cancers, including those at the metastatic stage, based on 3D cell cultures, which maximally mimic the in vivo tumor behavior. The prospects of the practical application of 3D cell culture models in preclinical drug screening and in personalized therapy were discussed. We also presented our data on in vitro 2D and 3D culturing of human cells on various substrates.

Key words: 3D cellular models, 3D bioprinting, biotechnology, extracellular matrix, cancer, translational medicine, personalized medicine, drug development, in vitro, *ex vivo*, oncology

Acknowledgements—The authors are grateful to Dr. E. Shabalina for providing part of the experimental data and to OKA-Biotech Company for the samples of recombinant spidroin.

Funding—The work was supported by a Grant from the Russian Science Foundation (no. 18-15-00391).

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-3-15