

Скворцова В.В., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б.

Выращивание культур опухолей в 3D-формате для исследования их ответа на лекарственное воздействие

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии

Насущной проблемой нашего времени является высокая токсичность и низкая эффективность химиопрепаратов, используемых в лечении онкологических заболеваний. Любая опухоль каждого конкретного пациента индивидуальна за счет особенной микрогетерогенности клеток, определенного набора молекулярно-генетических маркеров, собственного спектра продуцируемых биологических веществ и состава рецепторов. В связи с этим оптимальным методом для решения вопроса о выборе химиопрепарата для конкретного больного был бы подбор лекарства, избирательно подавляющего *in vitro* рост опухолевой культуры, приготовленной на основе клеток его опухоли. Такой подход становится возможным благодаря применению современных клеточных технологий выращивания культуры злокачественной ткани вне организма. Так же, как бактериологическое исследование является золотым стандартом для постановки диагноза инфекционного заболевания, исследование *in vitro* чувствительности на лекарственную терапию опухолевых клеток, взятых из организма, уже в ближайшее время может стать одним из стандартов обследования больных с онкологическими заболеваниями.

Наиболее эффективной и максимально приближенной по свойствам и организации к естественной опухоли системой, использующейся в настоящее время при скрининге потенциальных противоопухолевых препаратов [1], может быть система 3D-культуры, представленная сферическими конгломератами. Впервые выращивание подобных культур клеток документально отмечено в 1944 г. Иоганесом Холтфретером [2], работавшим со сферическими агрегатами эмбриональных клеток, которые имитировали плотные ткани, бессосудистые опухоли, тела эмбрионов.

Клеточный рост монослойной культуры, уже широко используемой в доклинических испытаниях, по многим параметрам не отражает истинной картины роста опухоли в живом организме, где огромное значение в ее прогрессии имеют взаимодействия не только между клетками самой опухоли, но и с окружающим ее экстраклеточным матриксом, представленным в своей основе клетками соединительной ткани и коллагеновыми волокнами. Особенности роста отдельных клеток опухоли в монослойной, 2D- и 3D-культурах влияют на характер реакции опухолевой культуры в ходе экспериментального лекарственного воздействия. Известно, что клетки опухоли в 3D-культуре более устойчивы к химиотерапии, показывают ограниченную способность к поглощению химиопрепаратов, в отличие от клеток в 2D-культуре. Так, антиапоптотический белок Bcl-2 семейства под действием противоопухолевого агента - доцетаксела в монослойной культуре клеток рака легкого обнаруживается в меньшем количестве по сравнению с 3D-культурой, что говорит о более агрессивном и лекарственно устойчивом поведении опухолевых клеток в трехмерных ассоциациях [3].

Различная чувствительность к химиотерапии клеточных культур, выращенных в 2D- и 3D-режимах, обнаружена и исследована во многих работах. Например, в работе Vörsmann H. et al. [4] при изучении чувствительности TRAIL-рецептора 2D-клеточных линий меланомы к направленной химиотерапии было выявлено, что при сублетальном облучении ультрафиолетом культуры, будучи до этого резистентными к TRAIL-опосредованной гибели, стали чувствительными через активацию каспазы-3-зависимого расщепления X-ассоциированного белка, ингибирующего апоптоз. Сходные, но менее выраженные результаты были получены при воздействии цисплатина. Но в 3D-клеточной культуре меланомы цисплатин оказался более эффективным активатором TRAIL-опосредованного апоптоза, чем ультрафиолет [4].

В настоящее время для создания экстраклеточного матрикса для 3D-культур предлагаются различные методические подходы. Первый подход связан с применением компонентов естественных тканей – коллагена, базальных мембран, алгината (вещества, получаемого из водорослей), фибрина, хитозана, клеток соединительной ткани, в т.ч. кератиноцитов. Второй подход связан с использованием синтетических материалов – модифицированных форм гиалуроновой кислоты, полиэтиленгликоля, самоорганизующихся гидрогелей белков, поликапролактона и др. Недостатками природных компонентов являются: биологическое разнообразие, слабая механическая составляющая, риск иммунного ответа или передачи патогенного фактора, невозможность жесткого контроля и независимой модификации свойств, что приводит к возможности диагностических ошибок и отсутствию стандартизированных условий. Главным недостатком синтетических материалов служит низкая биоактивность или ее полное отсутствие [1, 5].

Уже первые методики выращивания трехмерных культур опухолей убедительно обосновали характер роста 3D-культуры опухоли *in vitro* как *in vivo*-подобный. Клеточные популяции в 3D-культуре сохраняли свою гетерогенность, что не отличало полученные опухоли от развивающихся в естественных условиях организма. Так был получен рост в культуре 17 типов опухолей легкого, различных отделов кишечника, кости, шеи, почки, простаты, желудка, щитовидной железы, яичника и яичка, кожи, образцы которых были получены интраоперационно. Рост поддерживался в среде до 100 и более суток. Ткани организма как макро- и микроокружение развивающейся опухоли в данном исследовании заменяли коллагеновым гелем. Дифференциация в культурах опухолей подтверждалась также тем, что при культивировании клеток рака легкого в виде суспензии одни образовывали конгломераты и центры роста во взвешенном состоянии, другие – мигрировали к пластиковым стенкам чашей и образовывали гнезда роста пристеночно, что косвенно может свидетельствовать о большей или меньшей их злокачественности. Культуры опухолей при росте в экспериментальных условиях не потеряли своей злокачественности. Так, в работе Freeman A.E. and Hoffman R.M. [6] при трансплантации 5 млн. клеток меланомы, полученной от больного и культивируемой затем в культуре в течение девяти месяцев, трем тимусэктомизированным мышам, у каждой из них выросла опухоль размерами до 1/3 и более от размера самой мыши в течение 2,5 месяцев. То есть объективно было показано сохранение черт злокачественности в 3D-культурах клеток *in vitro*: в коллагеновом геле наблюдался инвазивный рост клеток рака желудка, а клетки меланомы продолжали продуцировать меланин после прекращения пролиферации.

В создании трехмерных тканей, в зависимости от поставленных целей и выбранного оборудования, может быть выделено пять основных направлений: создание платформы со средой, имитирующей микроокружение опухоли, без подложки – для роста

опухолевой ткани в виде сфероидов; применение подложек, создающих определенное ограничение в росте; использование гелей, например, полимерных гидрогелей при создании условий для формирования сфероидов опухолевых клеток в модели «подвешенных капель»; создание биореакторов для постоянного контроля биохимического состава среды, в которой формируется опухолевая культура, подачи питательных веществ и отвода продуктов распада, метаболитов; а также использование микрочипов [7]. 3D-подложки обеспечивают поверхность, плотную и упругую среду для роста клеток опухоли, поэтому к ним предъявляется ряд особых требований: пористость, взаимоположение пор, геометрия пор, их размер и распределение. Кроме того, элементы микроуровня опосредуют транспорт, диффузию питательных веществ и метаболитов и даже способны влиять на активность определенных генов и поведение клеток, их пролиферацию и дифференцировку.

Конгломераты клеток (сфероиды) в 3D-культуре представляют собой подобие бессосудистых опухолевых узлов, микрометастазов или межкапиллярных участков солидных опухолей, как было показано в работе Holtfreter J. [2]. В работе Vörsmann H. et al. [4] на начальном этапе выращивания клеток в 3D-культуре для формирования сфероидов, например злокачественной меланомы, получали капли среды со взвесью клеток методом «подвешенной капли» при соотношении 250 клеток в 25 мкл среды RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium). Такие капли помещались на противoadгезионную поверхность чашки Петри с фосфатным буфером. Сфероиды инкубировались в течение 15 дней при 37°C и 5%-м содержании CO₂. Через каждые трое суток производилась смена 8 мкл среды каждой капле. Затем, для подтверждения метастатического характера роста определенных клеточных линий меланомы, сфероиды конкретного числа и размера, полученные в каплях, вносили в органоподобные эквиваленты кожи, состоящие из кератиноцитов, фибробластов и коллагена, где на 31 день культивирования сфероиды достигали диаметра в 500 мкм. Полученные сфероиды клеток меланомы при определении терапевтической эффективности лекарственных средств обладали следующими особенностями: количество и размер гнезд роста меланомы в культуре были непредсказуемы; получаемые гнезда роста клеток меланомы в культуре обычно меньше, чем метастазы опухоли в организме; в связи с ограниченной продолжительностью жизни полученных гнезд лечебное воздействие начиналось раньше, и негативное влияние воздействия могло с течением времени накладываться на естественные процессы регрессии роста опухоли [4].

При изучении влияния лекарственных средств в 3D-культуре злокачественных клеток необходимо учитывать такие факторы, как растворимость, химическую и метаболическую стабильность, связывание с белками и захват клетками вещества из среды для детального понимания механизмов терапевтического воздействия *in vitro*. Также важно понимать и неоднородность процессов диффузии и метаболизма клеток внутри опухолевого узла: к центру будет нарастать гипоксия и нехватка питательных субстратов, проявляющиеся градиентом снижения митотической активности и некротическими изменениями, что напрямую ограничивает диффузию лекарственного вещества внутри опухоли. В работе Justice B.A. et al. [3] были предложены модели роста культур опухолевых клеток с ограниченной диффузией: в виде колоний в коллагеновых гелях, как «гистокультуры» и как клеточные мультислой на 96-луночном планшете с V-образным дном.

В работе Szot C.S. et al. [8] были проведены сравнительные исследования свойств опухолевых клеток в разных клеточных культурах – монослое, 2D- и 3D-культурах на терапевтическое воздействие. Для сравнительной оценки эффективности действия противоопухолевого препарата доксорубицина и наночастиц и степени их поглощения отдельными клетками в монослое и мультиклеточными сфероидами размером 100-300 мкм использовали клеточные линии немелкоклеточного рака легкого. Было установлено, что для подавления роста сфероидов требовались в 60 и более раз большие концентрации таких препаратов, как доцетаксел, цисплатин, гемцитабин, 5-флуороурацил, камптотецин, чем для клеток в монослое. Например, при концентрации доцетаксела в пределах 100-175 мкм общее число сфероидов было на 50% меньше, чем в контроле. При выявлении клеток в состоянии апоптоза (по экспрессии активированной каспазы-3) зафиксировано их меньшее количество в 3D-системе (в 2,09 и 2,47 раза для 5-флуороурацила и камптотецина, соответственно), чем в монослойной культуре. При изучении проникновения доцетаксела и наночастиц внутрь клеток сфероидов установлено, что внутри мультислойных конгломератов оказалось только 10,52 % доцетаксела после двухчасовой экспозиции, а инфильтрация наночастицами наблюдалась только по периферии сфероидов [8].

Данные, полученные авторами в работе [9], свидетельствуют о существенных отличиях во взаимоотношениях между самими опухолевыми клетками в монослое и трехмерных культурах, в котором они связаны с экстраклеточным матриксом. Такая связь опухолевых клеток в 3D- моделях и обуславливает их большую лекарственную устойчивость к лекарственной терапии, по сравнению с 2D-культурами, что в результате свидетельствует о большей адекватности 3D- модели роста реальным условиям прогрессии опухоли в организме [9].

Техника выращивания трехмерных клеточных культур постоянно совершенствуется. Так, система Alvetex® предлагает одновременно в одной питательной среде (буквально в одной лунке) выращивать несколько культур (чаще две), как мультислойных, так и монослойных, в различных сочетаниях за счет особой конструкции применяемой посуды, обеспечивающей оптимальный доступ питательных веществ из среды к культурам [10].

В последние годы направление воспроизведения, изучения и применения живых тканей в трехмерном измерении переходит на микроуровень, в том числе на микрочипы. Созданы условия и предпосылки для изучения биологических структур, систем и человеческого организма *in vitro*. Т.н. «орган на чипе» представляет собой микросистему, объединяющую достижения в сфере микрожидкостных технологий и клеточного культивирования с использованием структур микрочипа. При этом используются микроколичества жидкости (от 1/10⁸-1/10⁶ л), которые, проходя по микроканалам системы, позволяют выявить градиенты распределения конкретных веществ в определенных слоях воспроизводимой ткани и даже внутри самой ткани. Такие системы позволяют воспроизводить ключевые структуры, функциональные, биохимические и механические особенности живых органов, таких как легкое, печень, почка, кость, мозг, глаз и др., формировать модели патологии и схемы терапевтического воздействия [11].

Например, «легкое-на-чипе» выглядит как два поли-диметил-силоксановых (т.е. из разновидности силиконовой резины) микрожидкостных канала, разделенных тонкой (10 мкм) и гибкой мембраной из той же силиконовой резины с порами диаметром 10 мкм. В такой микросистеме воспроизводятся циклические эффекты дыхания. Легкое-на-чипе было использовано в исследованиях по нанотоксикологии [12], в которых различные типы наночастиц вводились через воздушные каналы этой микросистемы. Проходя через эпителиальный и эндотелиальный клеточные слои путем транцитоза, силиконовые наночастицы (12 нм) вызывали цитотоксичность и воспаление, и были напрямую измерены в режиме реального времени в пределах

микроканала с помощью микрофлуориметрии. В подобной микросистеме при прохождении опухолевых клеток через поры мембраны были созданы условия для формирования гетероклеточных сфероидов в 3D- микрожидкостной культивируемой системе, что воспроизводило поведение клеток метастатического рака простаты в микроокружении [13]. Подобная стратегия в другом исследовании позволила установить внутрисудистую адгезию циркулирующих клеток рака груди в ответ на активацию эндотелия цитокином CXCL12 [14].

Таким образом, работа с 3D-злокачественными культурами клеток ведет к индивидуальной, направленной и максимально эффективной противоопухолевой терапии с минимизацией рисков побочных эффектов и неоправданного длительного, часто неэффективного применения химиотерапии. Пока подобная специфика действий в нашей стране остается неразвитой. Более активно по пути создания 3D-тканей, а точнее, выращиванию целых органов, движется только трансплантология. В настоящее время российскими учеными на базе инновационного центра «Сколково» ведется разработка проекта по определению генетического профиля каждой опухоли, обуславливающего чувствительность/устойчивость конкретного злокачественного новообразования конкретного больного к определенным противоопухолевым препаратам, в результате на основе данных генетики обосновывается выбор определенной таргетной терапии. Однако это довольно дорогостоящий проект, требующий сложного оборудования и создания специализированных программ. В связи с этим, развитие «культурального» направления персонализированной химиотерапии онкологических больных представляется более экономически выгодным и перспективным для практического применения в медицине.

Литература

1. Мингалеева Р. Н., Соловьева В. В., Блатт Н. Л., Ризванов А. А. Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro* // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия (КТТИ). 2013. Т. VIII, № 2. С. 20-28.
2. Holtfreter J. A study of the mechanics of gastrulation // J. Exp. Zool. 1944. Vol. 95. P. 171-212.
3. Justice B. A., Badr N. A., Felder R. A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays // Drug discov today. 2009. Vol. 14. P. 102-107.
4. Vörsmann H., Groeber F., Walles H., Busch S., Beisert S., Walczak H., Kulms D. Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for *in vitro* drug testing // Cell Death Dis. 2013. Vol. 4. :e719. doi: 10.1038/cddis.2013.249.
5. Yamada K. M., Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D // Cell. 2007. Vol. 130. P. 601-610.
6. Freeman A. E., Hoffman R. M. In vivo-like growth of human tumors *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 2694-2698.
7. Nathan B. Cell culture: building a better matrix // Nature Methods. 2009. Vol. 6. P. 619-622. doi:10.1038/nmeth0809-619.
8. Godugu C., Patel A. R., Desai U., Andey T., Sams A., Singh M. AlgiMatrix™ Based 3D Cell Culture System as an In-Vitro Tumor Model for Anticancer Studies // PLoS ONE. 2013. Vol. 8, № 1. e53708. doi:10.1371/journal.pone.0053708
9. Szot C. S., Buchanan C. F., Freeman J. W., Rylander M. N. 3D *in vitro* bioengineered tumors based on collagen I hydrogels // Biomaterials. 2011. Vol. 32. P. 7905-7912.
10. Elliott N. T., Yuan F. A review of three-dimensional *in vitro* tissue models for drug discovery and transport studies // J Pharm. Sci. 2011. Vol. 100. P. 59-74.
11. Huh D., Hamilton G. A., Ingber D. E. From 3D cell culture to organs-on-chips // Trends in Cell Biology. 2011. Vol. 21, № 12. P. 745-754.
12. Huh D., Matthews B. D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H. Y., Ingber D. E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip // Science. 2010. Vol. 328. P. 1662-1668. doi: 10.1126/science.1188302.
13. Hsiao A. Y., Torisawaa Y., Tunga Y.-C., Sudb S., Taichmanc R. S., Pientab K. J., Takayamaet S. Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids // Biomaterials. 2009. Vol. 30. P. 3020-3027.
14. Song J. W., Cavnar S. P., Walker A. C., Luker K. E., Gupta M., Tung Y.-C., Luker G., Takayama S. Microfluidic endothelium for studying the intravascular adhesion of metastatic breast cancer cell // PLoS ONE. 2009. Vol. 4. e5756. DOI: 10.1371/journal.pone.0005756