

ПЕРВИЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК: СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ *IN VITRO*

И.В.Межевова*, А.О.Ситковская, О.И.Кит

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,
344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

РЕЗЮМЕ

В течение последних десятилетий перевиваемые клеточные линии являлись доступной моделью для изучения биологии и влияния химиотерапевтических препаратов на опухоли. Однако, многочисленные исследования показали, что данные клеточные линии недостаточно гетерогенны и не могут отражать лекарственную резистентность опухолей, возникающую у некоторых пациентов. Культуры первичных клеточных линий, выделенные из солидных опухолей, получили значительное распространение для определения химиочувствительности опухолей к препаратам, применяемым в химиотерапии. В данном обзоре рассматриваются основные методы получения и культивирования первичных клеточных линий. Дается краткая характеристика методикам дезагрегации опухолевого материала при помощи ферментативной, химической и механической диссоциации. Рассмотрены различные системы культивирования первичных клеточных культур. Выбор подходящего метода диссоциации и культивирования имеет важное значение для сохранения преимуществ первичной культуры в доклинических исследованиях.

Ключевые слова:

первичные культуры клеток, клеточные линии, методы диссоциации клеток, 2-D культуры, 3-D культуры, микрофлюидные платформы, эксплантаты

Для корреспонденции:

Межевова Ирина Валентиновна – младший научный сотрудник Лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

E-mail: mezhevova88@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>

SPIN: 3367-1741, AuthorID: 1011695

ResearcherID: AAI-1860-2019

Информация о финансировании: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:

И.В.Межевова, А.О.Ситковская, О.И.Кит Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания *in vitro*. Южно-российский онкологический журнал. 2020; 1(3): 36-49. <https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-3-4>

Получено 26.05.2020, Рецензия (1) 07.07.2020, Рецензия (2) 10.07.2020, Принята к печати 01.09.2020

PRIMARY TUMOR CELL CULTURES: CURRENT METHODS OF OBTAINING AND SUBCULTIVATION

I.V.Mezhevova*, A.O.Sitkovskaya, O.I.Kit

National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia,
63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

ABSTRACT

Over the past decades, transplantable cell lines have been an affordable model for studying the biology and effect of chemotherapeutic drugs on tumors. However, numerous studies have shown that these cell lines are not heterogeneous enough and cannot reflect the drug resistance of tumors that occurs in some patients. Primary cell line cultures isolated from solid tumors have become widespread in personalized cancer therapy. This review discusses the basic methods for the preparation and cultivation of primary cell lines. A brief description is given of the methods for the disaggregation of tumor material using enzymatic, chemical and mechanical dissociation. The systems of cultivation of primary cell cultures. The selection of an appropriate dissociation method and cultivation is important to preserve the benefits of primary culture in preclinical studies.

Keywords:

primary cell cultures, cell lines, method of cell dissociation, 2-D culture, 3-D culture, microfluidic platforms, explants

For correspondence:

Irina V. Mezhevova – junior researcher, laboratory of cell technologies National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

E-mail: mezhevova88@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>

SPIN: 3367-1741, AuthorID: 1011695

Web of Science ResearcherID: AAI-1860-2019

Information about funding: no funding of this work has been held.

Conflict of interest: authors report no conflict of interest.

For citation:

Mezhevova I.V., Sitkovskaya A.O., Kit O.I. Primary tumor cell cultures: current methods of obtaining and subcultivation. South Russian Journal of Cancer. 2020; 1(3): 36-49. <https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-3-4>

Received 26.05.2020, Review (1) 07.07.2020, Review (2) 10.07.2020, Accepted 01.09.2020

АКТУАЛЬНОСТЬ

Первичной культурой называют культуру клеток на стадии непосредственно после выделения клеток из образцов и до первого посева [1]. Культуры первичных опухолевых клеток представляют собой популяции *ex vivo*, выделенные хирургической резекцией фрагментов опухолевой ткани [2]. Первичные клеточные линии включают в себя как клетки опухоли, так и клетки микроокружения (фибробласты, Т-клетки, клетки эндотелия сосудов), играющие определенные роли в физиологии, структуре и функциях опухоли [3]. Опухоль и ее микроокружение способно вызывать взаимные изменения в фенотипе и функциях, поддерживающих непрерывный процесс канцерогенеза. Перевиваемые клеточные линии, полученные из небольшой доли опухолей, обычно очень агрессивных, являются наиболее распространенной *in vitro* моделью для исследований в онкологии. Однако, такие модели не обеспечивают представление всего спектра опухолевых субпопуляций. Первичные клеточные культуры отражают высокую гетерогенность клеток опухолей и представляют важный инструмент для исследований биологии опухолей и новых возможностей в персонализированной медицине в целом. Сохраняя клетки с фенотипами, подобными клеткам исходной опухоли, первичные клеточные линии играют важную роль в изучении механизмов химиорезистентности, поиска новых лекарственных веществ-кандидатов, что приобретает особую актуальность в доклинических исследованиях. Изучение взаимодействий между опухолевыми клетками и их микроокружением включает в себя разработку оптимальных моделей для исследования миграции и пролиферации опухоли [4]. В эпоху персонализированной терапии исследователям необходимо создание большего количества первичных опухолевых линий от пациентов, что обеспечит получение высококачественных данных для трансляции результатов *in vitro* в модели *in vivo* и, в конечном итоге, внедрение в клинику. В данном обзоре мы рассмотрим методы, доступные в настоящее время для генерации и культивирования первичных линий опухолевых клеток.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Выделение и культивирование опухолевых клеток в условиях *in vitro*, сходных с микроокружением

исходной опухоли, является сложной задачей и требует специальных методов. Успешное выделение опухолевых клеток с помощью подходящих технологий зависит от метода разрушения внеклеточного матрикса, который состоит из множества связанных между собой факторов (волокон соединительной ткани, гликопротеинов и тканеспецифичных белков). Дополнительные сложности в выделении первичной культуры клеток включают в себя наличие в образцах опухолевого материала:

1. клеточного дебриса и неопухолевых клеток, влияющих на пролиферацию опухолевых клеток, зачастую замедляя пролиферативную активность первичной культуры;
2. небольшого количества жизнеспособных клеток из-за резекции в некротической области;
3. фибробластов, активно пролиферирующих при культивировании [5].

На выделение достаточного количества жизнеспособных клеток и введение в первичную культуру оказывает влияние выбор подходящей методики диссоциации опухолевого материала. Существует несколько методов диссоциации материала и получения первичных клеточных линий из опухолей, однако очень немногие методы были признаны перспективными. Требуется разработка современных адаптированных под каждый вид опухолевой ткани методик для воспроизводимой генерации первичных клеточных линий из опухолей. В настоящее время для диссоциации опухолевых образцов используют такие методы, как механическая, химическая и ферментативная дезагрегация [6].

Ферментативная диссоциация

Ферментативная диссоциация является наиболее используемым методом для дезагрегации ткани и получения суспензии отдельных клеток опухоли, сохраняющая при этом их жизнеспособность и целостность. Обычно для диссоциации опухолей используют протеолитические ферменты, включая трипсин, папаин, эластазу, гиалуронидазу, коллагеназу, проназу и дезоксирибонуклеазу [7]. Некоторые исследователи используют смесь ферментов, например, комбинации коллагеназы/гиалуронидазы и раствор диспазы и ДНКазы для диссоциации образцов опухолей молочной железы [8]. В исследовании Volovitz et al. для ферментативной диссоциации тканей и опухолей головного мозга использовали нейтральную протеазу (NP) из *Clostridium histolyticum*, фермента,

ранее не использовавшегося в области нейробиологии. Диссоциация при воздействии протеазы позволила получить клеточную суспензию для введения в первичную культуру со значительно более высокой жизнеспособностью клеток по сравнению с ферментативным воздействием коллагеназы, ДНК-азы, папаина [9].

Использование трипсина и аккутазы в исследовании Skog et.al на аутодермальных трансплантах также показало получение клеток с большей жизнеспособностью после трипсинизации, но образцы, обработанные аккутазой, в дальнейшем лучше пролиферировали в первичной культуре. Не обнаружено существенного различия между средней интенсивностью флуоресценции маркеров стволовых клеток как после трипсинизации, так и после обработки аккутазой [10]. Для исследования первичных культур рака молочной железы Nishikata et.al использовали метод эксплантатов и получение суспензии клеток. Для диссоциации фрагмента опухоли использовали диспазу II. Наиболее эффективным методом для получения первичной культуры опухолей молочной железы признали получение суспензии клеток после диссоциации диспазой II [11]. Активно разрабатываются модели получения первичных культур нейронов головного мозга при помощи ферментативной диссоциации папаином для исследования клеточных и молекулярно-генетических особенностей функционирования головного мозга [12]. Внедряются протоколы перфузии фиброзной ткани печени мышей растворами проназы/коллагеназы и выделения звездчатых клеток печени мышей в первичную культуру [13].

Химическая диссоциация

Различные типы катионов поддерживают целостность клеточной поверхности и внутриклеточного структурного матрикса [7]. Химическая диссоциация — это процесс, при котором добиваются вымывания катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} из эпителиальных клеток, уменьшая межклеточные взаимодействия. Удаление Ca^{2+} и Mg^{2+} лучше всего достигается при воздействии ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или комплексов тетрафенилборона с ионами калия, которые используются для диссоциации тканей печени, клеток кишечной крипты и солидных опухолей молочной железы [14]. Гипертонические растворы сахарозы, мальтозы, лактозы воздействуют на ще-

левые контакты и участки плотных контактов, что обуславливает наличие кластеров клеток после ферментативного расщепления ткани [15]. Некоторые исследователи проводят двойную перфузию клеток печени ЭДТА/коллагеназой для выделения и культивирования первичных гепатоцитов, культивируя их с добавлением инсулина и глюкозы [16]. Trojanek со своими коллегами успешно получили 14 первичных линий меланомы, используя опухолевый материал, полученный от 45 пациентов, болеющих меланомой. На образцы опухолей воздействовали ЭДТА и ДТТ (дитиотреитол) [17].

Механическая диссоциация

Существует несколько вариантов механической диссоциации опухолей: обычная ручная гомогенизация и различные автоматические диссоциаторы для суспензий отдельных клеток. Механическая диссоциация ткани включает в себя измельчение резецированного образца опухоли ножницами или острыми лезвиями, гомогенизацию (при помощи BD Medimachine, Becton Dickinson), фильтрацию через нейлоновые фильтры или фильтры со стальной сеткой (с различным диаметром пор), встряхивание, повторную аспирацию через серологические пипетки или любое сочетание этих методов. Обычно образцы опухоли сначала измельчают на небольшие кусочки (примерно 1–2 мм), а затем промывают в тканеспецифичной среде или растворах солей (растворе Хэнкса, Дальбекко) для удаления слабосвязанных клеток или неспецифического мусора путем легкого перемешивания. Таким образом получают суспензию отдельных клеток. Механическая диссоциация является простым, но эффективным методом для выведения первичных клеточных линий колоректального рака, полученных от первичных опухолей с эффективностью 39,4%, а также клеточных линий, выделенных из соответствующих метастазов в лимфатических узлах, с эффективностью до 70% [18]. Тем не менее, некоторые исследователи считают, что данный вид диссоциации опухолевой ткани с использованием механических методов приводит к значительной гибели клеток и не подходит для получения опухолевых клеток и введения их в первичную культуру [19].

Сравнивая механическую и ферментативную диссоциацию первичной глиобластомы, некоторые исследователи отдают предпочтение ферментативным методам, получая клетки с более высо-

кой миграционной активностью [20]. Qiu X et.al разработали микрофлюидное устройство, позволяющее проводить более мягкую механическую дезагрегацию клеток, используя сеть каналов и «гидродинамические скальпели» [21]. В исследовании Kar et.al успешно получали первичные клеточные линии рака яичника как с помощью механической диссоциации ткани, так и ферментативно с помощью Dispase II [22].

Собственные данные

Лабораторией клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России проводилось изучение возможности применения коллагеназы из гепатопанкреаса краба для выделения опухолевых стволовых клеток молочной железы. Изучив воздействие коллагеназы в трех концентрациях и варианте без применения коллагеназы (использував только механический метод дезагрегации), получили более высокую концентрацию живых клеток при применении ферментативной дезагрегации [23].

В следующем исследовании использовали опухолевый материал, полученный от пациентов с астроцитарной опухолью. Диссекцию опухоли проводили хирурги отделения нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России под визуальным контролем с применением блока Blue E400 микроскопа Ormī Pentero™ и 5-АЛК (5-аминолевулиновой кислоты). Дезагрегацию опухолевой ткани осуществляли при комнатной температуре на BD Medimachine (Becton Dickinson, США) в стерильных Medicons (Becton Dickinson, США) с диаметром пор 50 мкм. В результате исследования были получены клеточные линии низкодифференцированной астроцитарной опухоли из материала после диссекции новообразования, также было показано, что данный метод является эффективным, так как обеспечивает возможность отбора материала с жизнеспособными клетками [24].

Проводили выделение опухолевых стволовых клеток из опухоли мозга для получения первичных клеточных линий. Первоначально ткань новообразования подвергали механической или ферментативной диссоциации. Механическую диссоциацию ткани опухолей осуществляли в BD Medimachine (Becton Dickinson) в растворе Хэнкса при комнатной температуре. Ферментативная диссоциация проводилась с применением набора реагентов Brain Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec)

в соответствии с инструкцией производителя. По результатам проведенных испытаний различных сочетаний приемов диссоциации ткани (использование набора или применение механической диссоциации) было установлено, что для опухолей мозга оптимальный результат достигался при применении ферментативного набора. Количество живых клеток при этом было в среднем меньше, чем при механической диссоциации, однако доля живых клеток была в 2 раза выше. Кроме того, ферментативная обработка ткани позволяла получить более однородную суспензию, в которой клетки хорошо разделялись и не образовывали конгломератов при последующих циклах центрифугирования и ресуспендирования.

СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ

Существует несколько видов культивирования первичных клеточных линий после диссоциации ткани опухоли. Суспензию опухолевых клеток можно культивировать в 2D-культуре (монослой клеток), 3D-культуре (сфероиды, гели, скаффолды), используя микрофлюидные технологии, эксплантаты (культивирование фрагментов опухоли небольшого размера). После дезагрегации материала клетки культивируют в питательной среде, внося необходимые тканеспецифичные добавки, фетальную бычью сыворотку, аминокислоты, антибиотики. Питательные среды дополняют различными факторами, обнаруживаемыми *in vivo*. Для поддержания жизнеспособности, обеспечение сохранности генотипа и фенотипа опухолевых клеток *in vitro* в питательные среды вносят митогенные факторы роста [25].

2D культуры

2D-культурами называют обычные монослойные культуры, выращенные в условиях, не отражающих условия *in vivo*: физиологию тканей, микроокружение опухоли. Суспензию опухолевых клеток высевают на чашки Петри, культуральные планшеты или флаконы, проводя пассажи по мере образования первичной культурой монослоя. После выделения из ткани и перехода в 2D-условия морфология клеток изменяется, как и способ их деления. Изменение фенотипа клеток является результатом 2D культивирования, что может влиять на их функцию, организацию внутриклеточ-

ных структур, секрецию цитокинов и передачу сигналов клетками. Из-за нарушений во взаимодействии с внешней средой прикрепленные к поверхности пластика клетки теряют свою полярность, что приводит к изменению ответа этих клеток на индукторы апоптоза. Другим недостатком 2D-культуры является то, что клетки в монослое имеют неограниченный доступ к ингредиентам среды, таким как кислород, питательные вещества, метаболиты и сигнальные молекулы. Для клеток опухоли *in vivo* доступность питательных веществ, кислорода и т.д. является более изменчивой из-за естественной архитектуры опухолевой массы. Отмечается, что 2D-система изменяет экспрессию генов, биохимию клетки. Из-за многих недостатков 2D-систем культивирования клеточных линий возникла необходимость поиска альтернативных моделей. К достоинствам 2D культур относят простоту в работе и их низкую стоимость. Для выращивания 2D-культур опухолевых клеток используют специальный пластик с покрытием для монослойных клеточных линий или пластик, покрытый коллагеном, D-лизином или смесью различных компонентов [25].

3D культуры

3D-культивирование опухолевых клеток в настоящее время применяется в исследованиях, как в персонализированной медицине, так и в рамках регенеративной медицины. Данная технология наиболее точно отображает процессы, происходящие в опухоли *in vivo* и воссоздает фенотип опухоли, что является ценным инструментом для изучения биологии опухоли, а также позволяет проводить доклиническую оценку противоопухолевых лекарств-кандидатов на первичных клеточных линиях. В настоящее время наиболее часто используют модель, включающую в себя небольшие клеточные агрегаты — сфероиды — которые десятилетиями использовались онкологами [26]. Применение сфероидов клеточных культур для оценки эффективности противоопухолевых лекарств не является новой концепцией. В течение почти 50 лет анализ образования колоний в мягком агаре был золотым стандартом *in vitro* метода, используемого для установления статуса трансформации клеток, а также тестирования новых препаратов-кандидатов с низкой пропускной способностью [27]. На рисунке 1 — пример сфероидов, полученных в собственных исследованиях в Ла-

боратории клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Опухолевые сфероиды формируют, используя различные методы и приемы: метод «висячей капли»; культивирование на пластике с неадгезивным покрытием; с помощью скаффолдов: гидрогелей; применяя магнитные мешалки и биопечать.

Метод «висячей капли» изначально использовался в микробиологии для изучения и культивирования бактерий. Суспензию опухолевых клеток помещают на внутреннюю сторону крышки чашки Петри и накрывают чашку, содержащую фосфатно-солевой буфер для предотвращения высыхания капель. На кончике капли происходит агрегация клеток на границе раздела фаз воздух-жидкость и затем образуются сфероиды [28]. В этом методе не требуется использование каких-либо веществ в качестве матрикса или каркаса. Однако размер капель не должен быть слишком большим — капли с объемом жидкости более 50 мкл не прикрепятся к чашке Петри, поскольку поверхностное натяжение жидкости преодолевается под действием силы тяжести. Замену питательной среды необходимо проводить аккуратно, чтобы не повредить образовавшийся сфероид.

Пример протокола метода «висячей капли» для создания сфероидов (постоянные линии) указан в таблице 1 [29].

Используя метод «висячей капли» сфероиды можно поддерживать в культуре до нескольких недель.

Исследователями Jeppesen et. al. был разработан протокол получения сфероидов из образцов ткани колоректального рака (табл. 2).

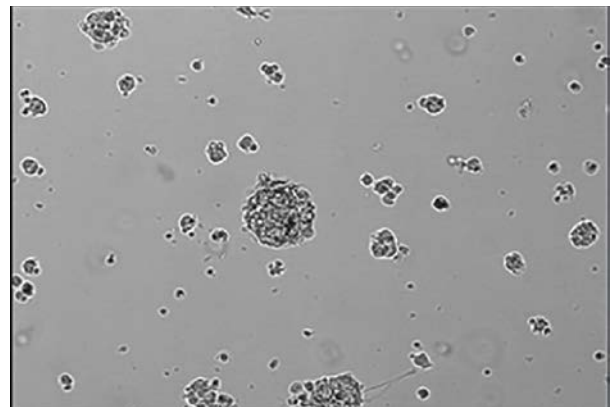


Рис. 1. Культура сфероидов, полученных из глиальной опухоли. Увеличение $\times 100$.

Из 18 аденокарцином, применяя данный протокол, сфероиды были успешно созданы для 15 образцов. Также проводили оценку принадлежности сфероидов первичной культуры колоректального рака к гистотипу исходной опухоли. Один из

подходов к повышению эффективности лечения заключается в определении химиочувствительности опухолевых клеток, полученных из материала пациента. Сравнение сфероидов с образцом первоначальной опухоли показало, что клетки

Таблица 1. Протокол метода «висячая капля».

№ п/п	Действие
Приготовление суспензии клеток	
1	Клеточные линии культивируйте до образования монослоя. Дважды отмойте клетки буфером ДПБС, деконтируйте жидкость. Добавьте 2 мл 0,05% трипсина – 1мМ ЭДТА, инкубируйте при 37 °С. Контролируйте открепление клеток. Внесите 2 мл полной питательной среды для инактивации трипсина. Ресуспенсируйте клетки. Перенесите в центрифужную пробирку на 15 мл.
2	Внесите 40 мкл 10 мг/мл ДНКазы, инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре. Встряхните пробирку, центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут.
3	Удалите супернатант, промойте осадок 1 мл полной питательной средой. Повторите, затем ресуспенсируйте клетки в 2 мл полной питательной среде.
4	Подсчитайте клетки с помощью гемоцитометра или автоматического счетчика клеток. Необходимая концентрация клеток – $2,5 \times 10^6$ в 1 мл.
Формирование «висячих капель».	
5	На дно чашки Петри 60 мм внесите 50 мл фосфатно-солевого буфера.
6	Снимите и переверните крышку с чашки Петри. Дозатором на 20 мкл поместите капли по 10 мкл питательной среды с клетками на дно крышки так, чтобы они не касались друг друга. На одной крышке располагается не менее 20 капель.
7	Аккуратно переверните крышку и закройте чашку Петри. Инкубируйте при 37°C, 5% CO ₂ , 95% влажности. Ежедневно микроскопируйте чашки, культивируйте до образования клеточных агрегатов.
8	После формирования агрегатов, их можно перенести в круглодонные стеклянные шейкеры в 3 мл полной питательной среды. Инкубируйте на встряхиваемой водяной бане при 37°C, 5% CO ₂ до образования сфероидов.

Таблица 2. Протокол получения сфероидов из образцов ткани колоректального рака.

№ п/п	Действие
1	Опухолевую ткань промойте в фосфатно-солевом буфере, содержащем антибиотики. Жировые и некротические участки удалите стерильными инструментами (скальпелем или ножницами).
2	Опухолевый материал измельчите на кусочки размером 1 ± 2 мм.
3	Внесите фосфатно-солевой буфер, содержащий 1 мг/мл коллагеназы типа II (Gibco) и антибиотики. Проведите инкубацию образца с ферментами в течение 20 минут при 37°C.
4	Пропустите суспензию ткани через несколько фильтров в следующей последовательности: фильтр 230 мкм (Sigma-Aldrich), 100 мкм (BD Biosciences), 40 мкм (BD Biosciences) и фильтр предварительного разделения 30 мкм (MACS, Miltenyi Biotec).
5	Образцы ткани, не прошедшие через фильтр 230 мкм, соберите и инкубируйте с коллагеназой (п.2) в течение 10 мин при 37°C. Пропустите через фильтры.
6	Фрагменты опухоли соберите с фильтров 100,40 и 30 мкм, разделите на три фракции в соответствии с размером отфильтрованных клеток.
7	Изолированные фрагменты опухоли культивируйте в среде для стволовых клеток (Thermo Fisher) с добавлением антибиотиков (200 ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5 мкг/мл амфотерицина Б) в чашках Петри, покрытых агарозой (Sigma-Aldrich) при 37°C, 5% CO ₂ .

в культуре сохраняли гистологию аденокарциномы и паттерны экспрессии цитокератина 20 и раково-эмбрионального антигена. В данной работе скрининг химиочувствительности с использованием культур сфероидов пяти пациентов показал индивидуальные профили ответа на лекарственные препараты, что представляет собой многообещающую модель *in vitro* для использования в персонализированной медицине [30].

Монокультурные сфероиды, получаемые в исследованиях рака молочной железы *in vitro*, называют маммосферами. Имеются данные о том, что источником метастазов являются клетки рака молочной железы с фенотипом, подобным стволовым клеткам. Культура маммосфер часто используется для изучения стволовых клеток рака молочной железы [31].

Исследователи Lombardo и др. разработали протокол для получения первичных маммосфер из опухолевой ткани молочной железы человека после мастэктомии (табл. 3) [32].

Halfter et al. сравнили химиочувствительность сфероидов, полученных из HER2- положительных клеточных линий рака молочной железы со сфероидными из 120 образцов свежих тканей. Их результаты показали большую эффективность выхода и более низкую метаболическую активность сфероидов, полученных из первичных культур по сравнению со сфероидными, полученными из клеточных линий [33].

Qureshy-Baig et al. сообщили, что сфероиды первичного колоректального рака сохраняли свою хеморезистентность и генетические мутации по отношению к опухолевой ткани, из которой были выделены [34]. При исследовании колоректального рака Weiswald et.al. создали «колосферы», используя методику механической дезагрегации образца опухолевой ткани скальпелем и дробления его при помощи поршня шприца. Данную модель «колосфер» исследователи получили у 95% пациентов, успех культивирования такого типа сфероидов был связан с агрессивностью опухоли [35]. Jaganathan и его коллеги создали бескаркасную 3D-модель *in vitro* с использованием линий эпителиальных клеток рака молочной железы и фибробластов, культивируемых в инкубаторе на магнитной мешалке совместно с Nanoshuttles™. Фибробласты обнаруживались больше на периферии трехмерных структур, в то время как эпителиальные клетки находились в центре. В такой модели авторы старались воспроизвести гетерогенность опухолевого окружения, наблюдаемую *in vivo*, поэтому использовали фибробласты, имитируя таким образом внеклеточный матрикс. Обработка опухоли доксорубицином привела к угнетению роста полученной 3D-модели [36].

Культивирование в гелях

Взаимодействие клетки с внеклеточным матриксом (ВКМ) может модифицировать клеточ-

Таблица 3. Протокол получения маммосфер из опухолевой ткани молочной железы человека.

№ п/п	Действие
Опухолевый материал храните на холоде	
1	Перенесите образец в 100-мм чашку Петри. Удалите жировую ткань, используя стерильные инструменты.
2	Добавьте 2-3 мл DMEM/F12 и измельчите образец на кусочки размером около 1 мм ³ стерильным скальпелем.
3	Ресуспендируйте образцы опухоли в 10 мл DMEM, содержащей протеолитические ферменты (3000 Е/мл коллагеназы и 1000 Е/мл гиалуронидазы). Инкубируйте при 37°C в роторном шейкере, пока все фрагменты ткани не диссоциируют. Полная диссоциация занимает от 1 до 3 часов. Время диссоциации меняйте в зависимости от ткани. (Например, аденокарцинома молочной железы обычно труднее подвергается диссоциации по сравнению со слизистой карциномой). Оценку степени диссоциации проводите в гемоцитометре каждые полчаса.
4	Осаждайте фрагменты в течение 5 минут, затем перенесите супернатант в 15 мл коническую полипропиленовую пробирку и центрифугируйте при 200 g в течение 10 минут при комнатной температуре. Удалите надосадочную жидкость и ресуспендируйте клетки в 1-5 мл питательной среды для маммосфер (возможно использование специализированных питательных сред для выращивания опухолевых стволовых клеток или мезенхимных стволовых клеток).

ную организацию, функцию клеток и реакцию на терапию. В связи с этим возникает необходимость создания модели трехмерной культуры, повторяющей роль ВКМ *in vivo*.

В этом контексте применяют природные или синтетические гидрогели [27] природного происхождения (например, Matrigel™, коллаген, альгинат и фибрин), синтетические (например, полиэтиленгликоль или ПЭГ) и некоторые полусинтетические гидрогели, представляющие комбинацию синтетических и природных полимеров (например, гиалуронан, полипептиды) [30]. Клетки вносят в верхнюю часть матрикса после его затвердевания или смешивают с жидким гидрогелем. В обоих способах планшеты для культивирования клеток предварительно покрывают гидрогелем [37].

Примерами естественных каркасов являются Matrigel™ и коллаген. Matrigel™ представляет собой коммерческий ВКМ, в состав которого входят белки базальной мембраны из клеток опухоли мыши Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), такие как коллаген IV, энтактин, ламинин перлкан, матриксная металлопротеиназа-2 и факторы роста, необходимые для поляризации, регуляции роста, химиотерапевтической устойчивости и адгезии клеток [38]. Коллаген — наиболее распространенный фибриллярный белок — в составе ВКМ обеспечивает прочность, регулирует клеточную адгезию и участвует в миграции клеток и хемотаксисе. В трехмерных культурах часто используют коллаген I типа, однако может применяться и коллаген II и III типа [39]. Как и Matrigel™, коллаген варьируется от партии к партии и имеет низкую жесткость. Помимо этого, природные гидрогели могут вызывать иммуногенные реакции [40]. Изменчивость свойств может влиять на воспроизводимость результатов и ограничивать использование таких каркасов для скрининга лекарственных средств. Чтобы преодолеть недостатки природных гидрогелей, были разработаны синтетические альгинатные гидрогели. Использование синтетического гидрогеля позволяет контролировать биохимические и механические свойства ВКМ. Существуют гидрогели на основе ПЭГ, в состав которых могут входить молекулы клеточной адгезии, пептиды или биоактивные природные полимеры (коллаген, фибрин) для усиления клеточной активности [41]. Природные и синтетические гидрогели имеют свои ограничения для повторного определения опухолевого ВКМ. В качестве альтернативы могут

быть использованы полусинтетические гидрогели. Полусинтетические гидрогели могут обеспечивать контролируемую среду. Гиалуронан — основной компонент естественного ВКМ — является биосовместимым, биоразлагаемым полимером, не вызывающим иммунных реакций. Он обладает высокой аффинностью к рецепторам клеточной поверхности, участвующим в пролиферации, адгезии, миграции и дифференцировке клеток [42].

Спонтанное образование сфероидов: метод неадгезивной поверхности

В этом методе применяют предварительно покрытые пластины, в которых нижняя поверхность является гидрофильной, заряжена нейтрально и ковалентно связана с поверхностью сосуда из полистирола. Это покрытие предотвращает адгезию клеток к поверхности, в результате чего клетки вынуждены находиться во взвешенном состоянии и, следовательно, образовывать трехмерные сфероиды. Покрытие стабильно, нецитотоксично и не разлагается. Однако существует проблема, связанная с образованием неоднородных сфероидов [37].

3D-каркасные системы

De et.al представили новую 3D-систему для культивирования циркулирующих опухолевых клеток (CTCs) *ex vivo* из образцов крови пациентов с раком молочной железы с использованием скаффолдов на основе поли-ε-капролактона (PCL). Было показано, что данную 3D-каркасную систему на основе PCL можно использовать для изучения циркулирующих опухолевых клеток [43].

Поскольку при культивировании в монослое клеточные линии рака молочной железы утрачивают профили экспрессии генов исходной опухоли, была разработана модель культивирования клеток первичного рака молочной железы путем децеллюляризации ассоциированных с опухолью фибробластов на трехмерных полимерных скаффолдах. Наличие внеклеточного матрикса, полученного из фибробластов опухоли, осажденного на поликапролактоновом каркасе, способствует прикреплению и жизнеспособности клеток, что связано с более высокими уровнями фосфорилированной киназы, которая обеспечивает прикрепление клеток через интегрины. Отдельные клетки первичного рака молочной железы самоорганизуются в опухолевые сфероиды при длительном культивировании. В такой модели ответ опухолей,

полученных от разных пациентов на химиопрепараты, значительно отличался от образца к образцу. Авторы предлагают использовать данную модель в качестве платформы *ex vivo* для культивирования первичных клеточных линий для разработки эффективных и персонализированных схем химиотерапии [44].

Метод магнитной левитации

В этом методе клетки выращивают до 80% конфлюентности, обрабатывают гидрогелями, содержащими магнитный оксид железа (МОЖ) и культивируют в течение ночи [45]. Обработанные клетки трипсинизируют и помещают в ультранизко прикрепленную пластину. Одновременно на верхнюю часть пластины прикрепляется крышка с неодимовым магнитом. Сфероиды начинают формироваться в течение нескольких часов на границе фаз воздух-жидкость из-за притяжения к магниту. Когда клетки агрегируют друг с другом, они начинают синтезировать белки ВКМ, такие как коллаген, фибронектин и ламинин. Сфероиды можно инкубировать в течение нескольких дней, пока они не достигнут необходимого размера для исследования. Этот метод имеет много преимуществ: скорость роста сфероидов высока по сравнению с более распространенными методами; сфероиды образуют собственный ВКМ (нет необходимости в искусственном каркасе); сфероиды имеют размер в диапазоне мм² (этот размер лучше воспроизводит некротическую и гипоксическую области, обнаруженные в опухолях); и, наконец, они не требуют специализированной питательной среды. К недостаткам относится высокая стоимость МОЖ, а также их возможная цитотоксичность.

Микрофлюидные платформы

Микрофлюидные платформы — это устройства, в которых живые клетки можно культивировать и постоянно вводить в камеры микрометрового размера. Этот метод позволяет точно контролировать клеточную среду, обеспечивая непрерывное выделение факторов роста или питательных веществ [46]. В простейшей системе одна микрофлюидная камера содержит один тип культивируемых клеток. Также возможно изучить взаимодействие между различными типами клеток, чтобы воссоздать границы между различными тканями. Для этого микро-каналы соединяют друг с другом через пористые мембраны,

выстланные на противоположных сторонах разных типов клеток (опухоль/орган на чипе). Цель состоит в том, чтобы создать среду, в которой разные типы клеток могут взаимодействовать друг с другом. Органы на чипе позволили нам воссоздать всю сложную структуру и окружающую среду, такие как кожа и волосы [47], легкие [48], печень [49] и кишечник [50]. Этот метод удобен для высокопроизводительного тестирования на различные препараты, но требует специального оборудования. Недавно было разработано двухслойное микрофлюидное устройство, позволяющее формировать, культивировать и тестировать препараты на 5000 сфероидов опухолей единого размера с различной геометрией камеры культивирования (200x200 м² и 300x300 м²) [51].

Эксплантаты

Метод культуры эксплантатов клеток подходит для разработки первичных опухолевых клеточных линий. Данная методика представляет собой культивирование небольших кусочков тканей опухоли (размером 2–5 мм) в культуральной среде. Этот метод значительно облегчает сохранение нативной архитектуры тканей и микросреды, что более полно отражает взаимодействия в опухоли *in vivo*. Тем не менее, генетическая изменчивость может возникнуть и в перевиваемой культуре и сохраняться в средах, содержащих сыворотку. Кроме того, возможно изменение фенотипа клеток из-за неправильной ориентации эксплантата в культуральной среде. Этот метод требует последовательного субкультивирования для получения первичных опухолевых клеточных линий [6].

Методом прямой эксплантации индийским исследователям удалось получить первичные эпителиальные клетки ротовой полости с выходом до 90% без микробной экспансии в первичной культуре [52].

В исследовании Goldman et.al. предполагают наличие у опухолевых клеток динамической фенотипической гетерогенности, возникающей вследствие применения химиотерапии, вызывающей устойчивость к химиопрепаратам. Авторы использовали эксплантаты, выделенные из биопсийного материала пациентов с раком молочной железы для анализа клинических последствий метаболического перепрограммирования [53].

Baird et. Al. провели исследование STING-лиганда (лиганд, стимулирующий экспрессию гена интер-

ферона) на модели эксплантата от пациентов, перенесших резекцию по поводу рака головы и шеи для оценки реакции опухоли пациента на лиганд. Обработка лигандами STING приводила к статистически значимому увеличению секреции IFN- α в эксплантате [54].

Исследователи Muff et.al. считают, что метод эксплантата подходит для создания первичных клеточных линий саркомы костей и мягких тканей, полученных от пациента, что в свою очередь открывает возможности для молекулярного анализа и тестирования лекарств для такой гетерогенной группы опухолей [55].

Культуру солидных опухолей, основанную на эксплантатах, полученных от пациента (PDE), все чаще применяют для доклинической оценки новых терапевтических средств и для обнаружения биомаркеров. Используя масс-спектрометрию группа австралийских ученых определила степень поглощения энзалутамида в 11 эксплантах из образцов опухоли предстательной железы, полученных от 8 пациентов. При этом наблюдали неоднородную интенсивность сигнала химиопрепарата во всех образцах, более же высокую область сигнала лекарственного средства регистрировали в эпителиальной ткани образца с наибольшей концентрацией препарата [56].

PDE модель применяют и для изучения гормонозависимых опухолей, таких как рак предстательной железы и рак молочной железы. PDE культуры, полученные от пациентов с раком молочной или предстательной железы выращивали на желатиновой губке, что является высокопроизводительным и экономически эффективным методом, который сохраняет естественную архитектуру ткани, микросреду и ключевые онкогенные факторы [57].

В исследовании Ricciardelli et.al использовали тканевые фрагменты размером около 5 мм³ опухоли яичника после криоконсервации, полученные от пациентов. Было показано, что данный метод культивирования эксплантов с использованием даже предварительно криоконсервированной ткани позволяет получить жизнеспособные опухолевые клетки с исходным микроокружением опухоли для введения в первичную культуру [58].

Karekla et.al разработали платформу для оценки реакции на лекарственные препараты при немелкоклеточном раке легкого, что позволит проводить доклинические испытания новых ле-

карственных веществ-кандидатов. Исследователи предлагают использовать образцы опухолевой ткани, полученных непосредственно после операции. Авторами была описана оптимизированная модель культуры эксплантатов *ex vivo*, которая позволяет оценивать реакцию немелкоклеточного рака легкого на терапию при сохранении микроокружения опухоли [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение десятилетий золотым стандартом для доклинических исследований было использование клеточных линий. Однако продолжительное время, в течение которого клетки поддерживаются в монослое, субкультивирование клеточных линий, используемое для получения стабильного фенотипа, вносит вклад в изменение первоначального фенотипа клеточной популяции. Более тесное сотрудничество между клиницистами и исследователями, наряду с усовершенствованными лабораторными и методологическими подходами, привело к тому, что первичные клеточные линии стали многообещающей моделью в области исследований биологии опухоли, а также на данный момент открылись широкие перспективы применения данных культур в персонализированной медицине для доклинической оценки химиотерапевтических препаратов. Первичные клеточные линии обладают преимуществами сохранения исходного фенотипа и особенностей опухоли, ее микроокружения. Получение первичных культур является довольно сложным процессом в связи с небольшим количеством исходных опухолевых клеток, а также с частичной потерей жизнеспособности клеток после резекции опухоли и применения методов дезагрегации материала. Многие исследователи отдают предпочтение ферментативным методам диссоциации опухолевых тканей, так как механическая диссоциация является более «грубым» методом, при этом, возможно получение необходимого количества жизнеспособных клеток при применении двух методик одновременно. Традиционные 2D системы культивирования помогают изучать морфологию и функции опухолевых клеток, при этом происходит потеря важных компонентов межклеточного матрикса и межклеточных взаимодействий, значимых для дифференцировки и пролиферации клеток. 3D-культивирование первичных опухолевых линий позволяет создать условия культиви-

рования, близкие к условиям *in vivo*. Культивирование клеток в матриксе улучшает интеграцию сигнальных путей в клетках, повышает экспрессию биомаркеров. Основанные на скаффолдах методы культивирования первичных клеточных линий приобретают важное значение, особенно в последние два десятилетия. Эти методы потенциально могут преодолеть некоторые ограничения современных трехмерных методов культивирования клеток, таких как неравномерное распределение клеток, неадекватная диффузия питательных веществ и неконтролируемый размер клеточных агрегатов. Применение скаффолдов позволяет получить мембрану для прикрепления, пролиферации и миграции опухолевых клеток. Культура эксплантатов является

перспективным методом получения первичных клеточных линий для применения в персонализированной медицине и использовании в доклинических исследованиях для оценки ответа опухоли на новые лекарственные препараты-кандидаты. Разрабатываются новые методы и подходы к выделению и получению из образцов опухолей первичных клеточных линий. Выбор метода диссоциации опухолевого материала и способа культивирования первичной клеточной линии обеспечивает возможность изучения биологии опухоли в различных её аспектах и представляет собой превосходный доклинический инструмент для исследования опухоли в системах *in vitro*.

Участие авторов:

Межевова И.В. – написание текста, техническое редактирование, оформление библиографии.

Ситковская А.О. – научное и техническое редактирование.

Кит О.И. – научное редактирование.

Список литературы

1. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. Перевод с 5-го английского издания. Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2011.
2. Leithner K, Wohlschlaeger C, Stacher E, Lindenmann J, Hofmann NA, Gallé B, et al. Hypoxia increases membrane metallo-endopeptidase expression in a novel lung cancer ex vivo model – role of tumor stroma cells. *BMC Cancer*. 2014 Jan 25;14:40. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-40>
3. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
4. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Oct;14(10):611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
5. Hirata E, Sahai E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017 Jul 5;7(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026781>
6. Mitra A, Mishra L, Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol*. 2013 Jun;31(6):347–354. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.006>
7. Li W-C, Ralphs KL, Tosh D. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. *Methods Mol Biol*. 2010;633:185–196. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-019-5_13
8. Janik K, Popeda M, Peciak J, Rosiak K, Smolarz M, Treda C, et al. Efficient and simple approach to *in vitro* culture of primary epithelial cancer cells. *Biosci Rep*. 2016;36(6). <https://doi.org/10.1042/BSR20160208>
9. Volovitz I, Shapira N, Ezer H, Gafni A, Lustgarten M, Alter T, et al. A non-aggressive, highly efficient, enzymatic method for dissociation of human brain-tumors and brain-tissues to viable single-cells. *BMC Neurosci*. 2016 Jun 1;17(1):30. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0262-y>
10. Skog M, Sivilér P, Steinvall I, Aili D, Sjöberg F, Elmasry M. The Effect of Enzymatic Digestion on Cultured Epithelial Autografts. *Cell Transplant*. 2019;28(5):638–644. <https://doi.org/10.1177/0963689719833305>
11. Nishikata T, Ishikawa M, Matsuyama T, Takamatsu K, Fukushima T, Konishi Y. Primary culture of breast cancer: a model system for epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Anticancer Res*. 2013 Jul;33(7):2867–2874.
12. Spaethling JM, Na Y-J, Lee J, Ulyanova AV, Baltuch GH, Bell TJ, et al. Primary Cell Culture of Live Neurosurgically Resected Aged Adult Human Brain Cells and Single Cell Transcriptomics. *Cell Rep*. 2017 17;18(3):791–803. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.066>
13. Mederacke I, Dapito DH, Affò S, Uchinami H, Schwabe RF. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc*. 2015 Feb;10(2):305–315. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.017>
14. Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Liver cell culture techniques. *Methods Mol Biol*. 2009;481:35–46. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-201-4_4
15. Ribatti D. A milestone in the study of the vascular system: Wilhelm Roux's doctoral thesis on the bifurcation of blood vessels. *Haematologica*. 2002 Jul;87(7):677–678.
16. Damm G, Schicht G, Zimmermann A, Rennert C, Fischer N, Kießig M, et al. Effect of glucose and insulin supplementa-

tion on the isolation of primary human hepatocytes. *EXCLI J.* 2019;18:1071–1091.

<https://doi.org/10.17179/excli2019-1782>

17. Trojanek B, Niemitz S, Micka B, Lefterova P, Blasczyk R, Scheffold C, et al. Establishment and characterization of colon carcinoma and renal cell carcinoma primary cultures. *Cancer Biother Radiopharm.* 2000 Apr;15(2):169–174. <https://doi.org/10.1089/cbr.2000.15.169>

18. Krbala L, Soukup J, Stanislav J, Hanusova V. Derivation and basic characterization of colorectal carcinoma primary cell lines. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2017 Dec;161(4):360–368. <https://doi.org/10.5507/bp.2017.040>

19. Cunningham RE. Tissue disaggregation. *Methods Mol. Biol.* 2010;588:327–330.

https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_32

20. Skarkova V, Krupova M, Vitovcova B, Skarka A, Kasparova P, Krupa P, et al. The Evaluation of Glioblastoma Cell Dissociation and Its Influence on Its Behavior. *Int J Mol Sci.* 2019 Sep 18;20(18):4630. <https://doi.org/10.3390/ijms20184630>

21. Qiu X, De Jesus J, Pennell M, Troiani M, Haun JB. Microfluidic device for mechanical dissociation of cancer cell aggregates into single cells. *Lab Chip.* 2015 Jan 7;15(1):339–350. <https://doi.org/10.1039/c4lc01126k>

22. Kar R, Chawla D, Gupta B, Mehndiratta M, Wadhwa N, Agarwal R. Establishment of Primary Cell Culture From Ascitic Fluid and Solid Tumor Obtained From Epithelial Ovarian Carcinoma Patients. *Int J Gynecol Cancer.* 2017;27(9):2000–2005. <https://doi.org/10.1097/igc.0000000000001087>

23. Филиппова С.Ю., Ситковская А.О., Сагакянц А.Б., Бондаренко Е.С., Ващенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э. и др. Выделение опухолевых стволовых клеток рака молочной железы с применением коллагеназы. *Современные проблемы науки и образования.* 2019;6:147.

24. Межева И.В., Ситковская А.О., Росторгуев Э.Е., Филиппова С.Ю., Нистратова О.В., Кузнецова Н.С. и др. Нейрохирургический подход для получения первичных клеточных линий глиальных опухолей. *Исследования и практика в медицине.* 2019;6(5):191.

25. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018 Jun;14(4):910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

26. Burdett E, Kasper FK, Mikos AG, Ludwig JA. Engineering tumors: a tissue engineering perspective in cancer biology. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Jun;16(3):351–359. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0676>

27. Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov Today Technol.* 2017 Mar;23:27–36. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>

28. Jørgensen A, Young J, Nielsen JE, Joensen UN, Toft BG, Rajpert-De Meyts E, et al. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate

activin treatment effects in a preserved niche. *Br J Cancer.* 2014 May 13;110(10):2604–2014.

<https://doi.org/10.1038/bjc.2014.160>

29. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp.* 2011 May 6;(51). <https://doi.org/10.3791/2720>

30. Jeppesen M, Hagel G, Glenthoj A, Vainer B, Ibsen P, Harling H, et al. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PLoS ONE.* 2017;12(9): e0183074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183074>

31. Ahmad A. Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance. Challenges and Progress. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2019;1115:1–7. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6>

32. Lombardo Y, de Giorgio A, Coombes CR, Stebbing J, Castellano L. Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *J Vis Exp.* 2015 Mar 22;(97): 52671. <https://doi.org/10.3791/52671>

33. Hoffmann O, Ditsch N, Ahne M, Arnold F, Paepke S, et al. Testing chemotherapy efficacy in HER2 negative breast cancer using patient-derived spheroids. *J Transl Med.* 2016;14(1):112. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0855-3>

34. Qureshi- Baig K, Ullmann P, Rodriguez F, Frasilho S, Nazarov PV, Haan S, et al. What Do We Learn from Spheroid Culture Systems? Insights from Tumorspheres Derived from Primary Colon Cancer Tissue. *PLoS ONE.* 2016;11(1): e0146052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146052>

35. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015 Jan;17(1):1–15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>

36. Jaganathan H, Gage J, Leonard F, Srinivasan S, Souza GR, Dave B, et al. Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Sci Rep.* 2014 Oct 1;4:6468. <https://doi.org/10.1038/srep06468>

37. Hoarau- Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 18;19(1):181. <https://doi.org/10.3390/ijms19010181>

38. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005 Oct;15(5):378–386. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>

39. Doyle AD, Carvajal N, Jin A, Matsumoto K, Yamada KM. Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nat Commun.* 2015 Nov 9;6:8720. <https://doi.org/10.1038/ncomms9720>

40. Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 2009 Jul 1;103(4):655–663. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>

41. Tokuda EY, Jones CE, Anseth KS. PEG-peptide hydrogels reveal differential effects of matrix microenvironmental cues on melanoma drug sensitivity. *Integr Biol (Camb)*. 2017 23;9(1):76–87. <https://doi.org/10.1039/c6ib00229c>
42. Yu M, Jambhrunkar S, Thorn P, Chen J, Gu W, Yu C. Hyaluronic acid modified mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells. *Nanoscale*. 2013 Jan 7;5(1):178–183. <https://doi.org/10.1039/c2nr32145a>
43. De T, Goyal S, Balachander G, Chatterjee K, Kumar P, Babu K G, et al. A Novel Ex Vivo System Using 3D Polymer Scaffold to Culture Circulating Tumor Cells from Breast Cancer Patients Exhibits Dynamic E-M Phenotypes. *J Clin Med*. 2019 Sep 16;8(9):1473. <https://doi.org/10.3390/jcm8091473>
44. Nayak B, Balachander GM, Manjunath S, Rangarajan A, Chatterjee K. Tissue mimetic 3D scaffold for breast tumor-derived organoid culture toward personalized chemotherapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 Aug 1;180:334–343. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.056>
45. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*. 2016;163:94–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>
46. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006 Jul 27;442(7101):368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>
47. Ataç B, Wagner I, Horland R, Lauster R, Marx U, Tonevitsky AG, et al. Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion. *Lab Chip*. 2013 Sep 21;13(18):3555–3561. <https://doi.org/10.1039/c3lc50227a>
48. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*. 2010 Jun 25;328(5986):1662–1668. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>
49. Powers MJ, Domansky K, Kaazempur-Mofrad MR, Kalezi A, Capitano A, Upadhyaya A, et al. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol Bioeng*. 2002 May 5;78(3):257–269. <https://doi.org/10.1002/bit.10143>
50. Kimura H, Yamamoto T, Sakai H, Sakai Y, Fujii T. An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models. *Lab Chip*. 2008 May;8(5):741–746. <https://doi.org/10.1039/b717091b>
51. Patra B, Peng C–C, Liao W–H, Lee C–H, Tung Y–C. Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Sci Rep*. 2016 Feb 15;6:21061. <https://doi.org/10.1038/srep21061>
52. Shwetha HR, Kotrashetti VS, Babu NC, Kumbhar V, Bhat K, Reddy R. Ex vivo culture of oral keratinocytes using direct explant cell culture technique. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019 Aug;23(2):243–247. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_105_19
53. Goldman A, Khiste S, Freinkman E, Dhawan A, Majumder B, Mondal J, et al. Targeting tumor phenotypic plasticity and metabolic remodeling in adaptive cross-drug tolerance. *Sci Signal*. 2019 20;12(595). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aas8779>
54. Baird JR, Bell RB, Troesch V, Friedman D, Bambina S, Kramer G, et al. Evaluation of Explant Responses to STING Ligands: Personalized Immunosurgical Therapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 2018 01;78(21):6308–6319. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-1652>
55. Muff R, Botter SM, Husmann K, Tchinda J, Selvam P, Seeli-Maduz F, et al. Explant culture of sarcoma patients' tissue. *Lab Invest*. 2016;96(7):752–762. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.49>
56. Mutuku SM, Trim PJ, Prabhala BK, Irani S, Bremert KL, Logan JM, et al. Evaluation of Small Molecule Drug Uptake in Patient-Derived Prostate Cancer Explants by Mass Spectrometry. *Sci Rep*. 2019 18;9(1):15008. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51549-3>
57. Centenera MM, Hickey TE, Jindal S, Ryan NK, Ravindranathan P, Mohammed H, et al. A patient-derived explant (PDE) model of hormone-dependent cancer. *Mol Oncol*. 2018;12(9):1608–1622. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12354>
58. Ricciardelli C, Lokman NA, Sabit I, Gunasegaran K, Bonner WM, Pyragius CE, et al. Novel ex vivo ovarian cancer tissue explant assay for prediction of chemosensitivity and response to novel therapeutics. *Cancer Lett*. 2018 01;421:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.006>
59. Karekla E, Liao W–J, Sharp B, Pugh J, Reid H, Quesne JL, et al. Ex Vivo Explant Cultures of Non-Small Cell Lung Carcinoma Enable Evaluation of Primary Tumor Responses to Anticancer Therapy. *Cancer Res*. 2017 15;77(8): 2029–2039. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-1121>

Информация об авторах:

Межевова Ирина Валентиновна* – младший научный сотрудник Лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>, SPIN: 3367-1741, AuthorID: 1011695, ResearcherID: AAI-1860-2019

Ситковская Анастасия Олеговна – ВРИО заведующей Лаборатории клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>, SPIN: 1659-6976, AuthorID: 791081, Scopus Author ID: 56381527400, ResearcherID: E-7496-2018

Кит Олег Иванович – член-корр. РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>, SPIN: 1728-0329, AuthorID: 343182, Scopus Author ID: 55994103100, ResearcherID: U-2241-2017