

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СФЕРОИДОВ ИЗ PANC-1 ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ *IN VITRO* И СОЗДАНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ МОДЕЛИ *IN VIVO*

© 2022 г. С. Ш. Каршиева^{1, 2}, С. П. Кудан³, Ю. Д. Хесуани¹, В. С. Покровский², В. А. Миронов^{1, 4}, Е. В. Кудан¹. *

¹Лаборатория биотехнологических исследований “3Д Биопринтинг Солюшенс”, Москва, 115409 Россия

²ФГБУ НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

³Школа № 1568 им. Пабло Неруды, Москва, 127221 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*E-mail: koudan1980@gmail.com

Поступила в редакцию 10.08.2021 г.

После доработки 31.08.2021 г.

Принята к публикации 01.09.2021 г.

В последнее время сфероиды привлекают широкое внимание исследователей в качестве 3D моделей для тестирования лекарственных препаратов. Одной из ключевых особенностей сфероидов является то, что они могут состоять как из одного, так и из нескольких типов клеток. Существует гипотеза, что использование гетеросфероидов из нескольких типов клеток при тестировании противоопухолевых препаратов может позволить лучше воспроизвести структуру опухоли и, как следствие, повысить предиктивность исследования. Для проверки этой гипотезы в настоящей работе проведено тестирование активности восьми противоопухолевых препаратов на гомосфероидах, состоящих из клеток рака поджелудочной железы PANC-1, и гетеросфероидах из трех типов клеток: клеток рака поджелудочной железы PANC-1, первичных фибробластов человека и клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC. Установлено, что использование гетеросфероидов из нескольких типов клеток более точно отражающих микроокружение опухоли, не приводит к заметному изменению активности препаратов. Также проведена подкожная трансплантация сфероидов из PANC-1 иммунодефицитным мышам и показано, что полученная модель рака поджелудочной железы более эффективно воспроизводит агрессивный фенотип опухоли по сравнению с трансплантацией клеток в суспензии.

Ключевые слова: сфероиды, противоопухолевые препараты, антипролиферативная активность, цитотоксичность, опухолевая модель

DOI: 10.31857/S0041377122010059

Несмотря на стремительный прогресс в методах диагностики и улучшение показателей выживаемости многих видов рака, заболеваемость и смертность от рака поджелудочной железы продолжает расти во всем мире. Рак поджелудочной железы по-прежнему характеризуется высокой летальностью, низкой пятилетней выживаемостью, агрессивным течением заболевания и трудностями раннего выявления. По глобальным прогнозам, заболеваемость раком поджелудочной железы увеличится до 18.6% на 100000 человек в 2050 г. при среднегодовом приросте на 1.1% (Hu et al., 2021). В связи с этим использование моделей, релевантных клинической ситуации, для тестирования противоопухолевых препаратов имеет большое значение для эффективного лечения рака.

Монослойная 2D культура клеток широко используется в исследовательских лабораториях и фармкомпаниях для тестирования лекарственных препаратов. Это объясняется простотой работы с клетками в монослое, низкой стоимостью анализов и наличием отработанных протоколов. Однако в последнее время все большее распространение получают работы, в которых для тестирования лекарственных средств используют 3D культуры клеток, в частности сфероиды (Brajša et al., 2016a; Fang, Eglen, 2017). 3D модели лучше отражают архитектуру тканей и органов, обеспечивают все виды клеточных взаимодействий и взаимодействий клеток с внеклеточным матриксом (Akasov et al., 2016; Тригуб и др., 2019).

В большинстве работ наблюдается повышенная устойчивость сфероидов к химиотерапевтическим

препаратам по сравнению с монослоем клеток (Балалаева и др., 2017; Uematsu et al., 2018). Это может объясняться многими факторами, связанными с их внутренней организацией, такими как гипоксия, изменение клеточного метаболизма, кислая среда, клеточная гетерогенность, межклеточные взаимодействия и взаимодействия с внеклеточным матриксом (Weigelt et al., 2010; Liao et al., 2014; Hoffmann et al., 2015). Хотя большинство исследований продемонстрировали, что клетки в сфероиде более устойчивы к химиотерапии, чем клетки в 2D-монослоях, в некоторых исследованиях сфероиды оказались сравнимо или даже более чувствительны к противоопухолевым агентам, чем их двухмерные монослойные аналоги (Frankel et al., 2000; Brajša et al., 2016b).

Еще одним фактором, который может влиять на результаты тестирования, является диаметр используемых сфероидов. Известно, что кислород и питательные вещества могут проникать на расстояние, не превышающее 100–150 мкм (Kinney et al., 2014). Это означает, что для эффективного проникновения противоопухолевых препаратов в сфероид, его диаметр не должен превышать 250–300 мкм.

На сегодняшний день среди исследователей нет единого мнения относительно того, могут ли сфероиды состоять только из опухолевых клеток или необходимо добавление и других типов клеток.

Для применения в высокопроизводительном скрининге *in vitro* модель должна быть максимально простой и воспроизводимой. С этой точки зрения использование сфероидов, состоящих из одного типа клеток, значительно упрощает и ускоряет процесс тестирования. С другой стороны, создание смешанных сфероидов из нескольких типов клеток с целью воспроизведения микроокружения опухоли может улучшить предиктивность исследования.

Для тестирования противоопухолевых препаратов *in vivo* широко используются модели перевиваемых опухолей человека и животных. В настоящее время при подкожной трансплантации ксенографтов опухолей человека иммунодефицитным мышам используют суспензию опухолевых клеток. Однако не все опухолевые клетки человека обладают достаточной туморогенностью и способны формировать опухоли у животных. В ряде случаев происходит рассасывание трансплантированной клеточной суспензии. Такие же трудности возникают при адаптации к росту *in vivo* фрагментов опухолевых тканей, полученных от пациентов. Использование для трансплантации сфероидов, представляющих собой трехмерные структуры с активно делящимися клетками и микросредой, характерной для опухолевого окружения, может позволить избежать рассасывания трансплантата.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ активности восьми противоопухолевых препаратов на гомосфероиде, состоящих только из опухолевых клеток, и гетеросфероиде, состоящих

из опухолевых клеток, фибробластов и эндотелия. Также протестирована возможность создания опухолевой модели *in vivo* путем подкожного введения сфероидов иммунодефицитным мышам.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Формирование сфероидов из клеточной линии рака поджелудочной железы PANC-1 и смешанных сфероидов из PANC-1, первичных фибробластов человека HF и клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC. В работе использовали клетки рака поджелудочной железы PANC-1 (ATCC), первичные фибробласты человека HF (LONZA) и клетки эндотелия пупочной вены человека HUVEC (PromoCell). PANC-1 и HF культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 2 mM L-глутамин (Панэко, Россия) и 1-кратный раствор антибиотика-антимикотика (Gibco, США), с добавлением 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) при 37°C и 5% CO₂. HUVEC культивировали в среде M200 (Gibco, США), содержащей 1-кратный раствор добавки для роста (LSGS; low serum growth supplement; Gibco, США) и 1-кратный раствор антибиотика-антимикотика (Gibco, США) при 37°C и 5% CO₂. Для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена (Панэко, Россия) и 0.25%-ный раствор трипсина-ЭДТА (Gibco, США).

Сфероиды получали с помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием фирмы Corning (США). Для получения сфероидов из PANC-1 готовили суспензию клеток в культуральной среде с концентрацией 2500 клеток на миллилитр. В каждую ячейку планшетов вносили по 100 мкл суспензии. Для получения смешанных сфероидов из PANC-1, HF и HUVEC, готовили суспензии клеток в соответствующих культуральных средах с концентрацией 2500 клеток на миллилитр, после чего смешивали суспензии в отношении PANC-1 : HF : HUVEC = 1 : 9 : 4 и в каждую ячейку планшетов вносили по 100 мкл полученной смешанной суспензии. Для получения смешанных сфероидов из HF и HUVEC, готовили суспензии клеток в соответствующих культуральных средах с концентрацией 2500 клеток на миллилитр, после чего смешивали суспензии в отношении HF : HUVEC = 9 : 4 и в каждую ячейку планшетов вносили по 100 мкл полученной смешанной суспензии. Для формирования сфероидов планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 72 ч.

Оценка жизнеспособности сфероидов, обработанных противоопухолевыми препаратами. В исследовании использовали восемь противоопухолевых препаратов: доксорубин, фторурацил, винкристин (Тева, Нидерланды); цисплатин, этопозид (Эбеве Фарма, Австрия); оксалиплатин (Сановид, Франция); циклофосфамид (Бакстер, Германия); гемцитабин (Лилли, Франция). С помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием сформи-

ровали сфероиды с первоначальной концентрацией 250 клеток на сфероид. Через 72 ч к сфероидам добавили препараты в тестируемых концентрациях (10^{-3} – 10^{-8} М для доксорубина, цисплатина, этопозида и оксалиплатина; 10^{-2} – 10^{-7} М для фторурацила и циклофосамида; 10^{-5} – 10^{-10} М для винкристина и гемцитабина, шаг разбавления 3.16) и инкубировали в течение 72 ч. Через 72 ч в каждую лунку планшетов добавили тест-систему на живые клетки CellTiter-Glo 3D (Promega, США) в соотношении 1:1 по объему и инкубировали на протяжении 60 мин. Интенсивность люминесценции измеряли с помощью мультифункционального ридера Victor X3 (Perkin Elmer, США), далее абсолютные значения люминесценции нормализовали следующим образом: сигнал люминесценции сфероидов, необработанных противоопухолевыми препаратами, принимали за 100% жизнеспособности. Жизнеспособность рассчитывали как процентное отношение сигналов люминесценции обработанных и необработанных препаратами сфероидов. Для каждого препарата рассчитывали IC_{50} – концентрацию, при которой жизнеспособность равна 50%.

Эксперименты на животных. В опытах были использованы 8-недельные иммунодефицитные мыши-самки линии Balb/c nude весом 20–22 г ($n = 8$) из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Животных содержали в стерильном боксовом помещении с естественным освещением в клетках индивидуального содержания животных со свободным доступом к брикетированному корму и воде. В помещении поддерживали $26 \pm 2^\circ\text{C}$ температуры и $55 \pm 15\%$ влажности окружающего воздуха. Трансплантацию PANC-1 в виде клеточной суспензии проводили под кожу правого бока по 3.0×10^6 клеток в 500 мкл натрий-фосфатного буфера на мыш. С помощью агарозных форм были сформированы сфероиды из PANC-1, с концентрацией 2000 клеток на сфероид, согласно методике, описанной ранее (Кудан и др., 2021). 1-дневные сфероиды вводили с использованием иглы диаметром 18G по 1500 сфероидов на мыш. Измерение опухолевого узла проводили после введения опухолевых клеток 2 раза в неделю в течение 40 дней. Объем опухолевого узла определяли по формуле:

$$V = \frac{\pi}{6}LWH, \text{ где } L, W, H - \text{линейные размеры опухоли.}$$

Индекс прироста опухоли (I) вычисляли по формуле:

$$I_i = V_i/V_0, \text{ где } I - \text{индекс прироста опухоли, } i - \text{сутки эксперимента, } V_0 - \text{объем опухоли в день начала лечения.}$$

После последнего измерения на 40-е сут после трансплантации опухоли проводили эвтаназию животных путем цервикальной дислокации шейных позвонков. Все манипуляции с лабораторными животными были выполнены в соответствии с Между-

народными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (Большаков и др., 2002).

Анализ данных. Обработку экспериментальных данных и статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Все исследуемые концентрации препаратов тестировали в квадруплетах. Расчет IC_{50} проводили методом нелинейной регрессии с использованием трехпараметрической модели доза–эффект. Все эксперименты были проведены в четырех независимых повторах. В качестве описательных статистик в работе приведены среднее арифметическое, стандартная ошибка среднего (SEM) и стандартное отклонение (SD). Для сравнения количественных признаков в группах применяли одновариантный дисперсионный анализ ANOVA с post hoc тестом Тьюки и критерий Манна–Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование сфероидов. Для оценки суммарной антипролиферативной и цитотоксической активности противоопухолевых препаратов доксорубина, цисплатина, фторурацила, этопозида, оксалиплатина, циклофосамида, винкристина и гемцитабина было сформировано два вида сфероидов: сфероиды, состоящие только из клеток рака поджелудочной железы PANC-1, и сфероиды, состоящие из PANC-1, первичных фибробластов человека HF и клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC. Добавление к опухолевым клеткам двух других типов клеток позволило более точно воспроизвести состав опухоли и оценить, влияет ли более сложный состав сфероидов на полученные значения активности препаратов.

Для оценки цитотоксической активности тестируемых препаратов были использованы смешанные сфероиды, состоящие из HF и HUVEC. Оба типа клеток не пролиферируют в составе сфероидов, поэтому снижение количества метаболически активных клеток в сфероидах, обработанных препаратами, было результатом гибели клеток, а не торможения их пролиферации.

Как уже было упомянуто ранее, для полного проникновения тестируемых препаратов в центр сфероидов диаметр последних не должен превышать 250–300 мкм. Для исследования нами были сформированы сфероиды трех типов, состоящие из 250 клеток суммарно. Диаметры 3-дневных сфероидов из PANC-1, PANC-1 : HF : HUVEC и HF : HUVEC составляли 278 ± 26 , 196 ± 21 и 193 ± 19 мкм соответственно (рис. 1).

Влияние противоопухолевых препаратов на пролиферацию и жизнеспособность клеток в сфероидах. Тестируемые препараты были добавлены к 3-дневным сфероидам в различных концентрациях и через 72 ч

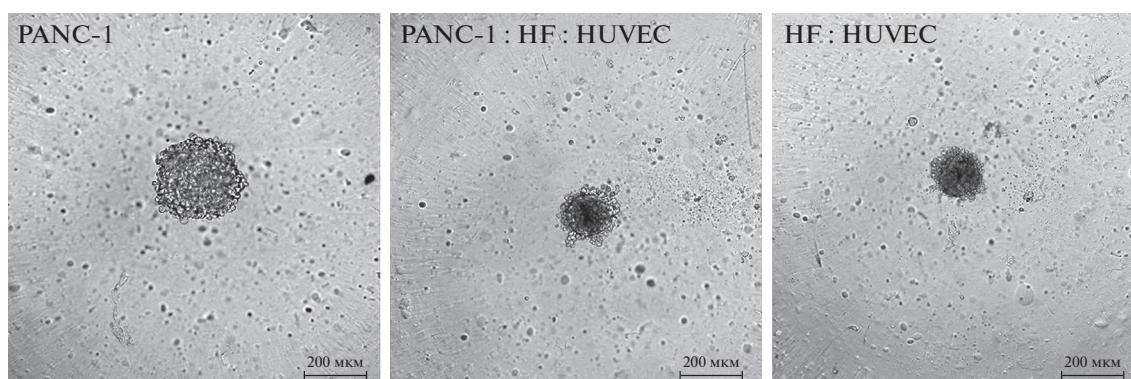


Рис. 1. Внешний вид 3-дневных сфероидов из PANC-1, PANC-1 : HF : HUVEC и HF : HUVEC. Фазово-контрастная микроскопия.

проведен анализ количества живых метаболически активных клеток с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D. Кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации тестируемых препаратов приведены на рис. 2. Значения полуингибиторных концентраций (IC_{50}), рассчитанных на основании кривых, указаны в табл. 1.

Как видно из рис. 2 и табл. 1, наибольшая активность препаратов проявляется на сфероиде, сформированном из трех типов клеток. Однако статистический анализ показывает, что разница между значениями IC_{50} для сфероидов из PANC-1 и сфероидов из PANC-1 : HF : HUVEC статистически не значима для всех препаратов, кроме винкристина. Но и в случае винкристина полученные значения IC_{50} очень близки и составляют 2.3 и 1.6 нМ.

Значения IC_{50} для сфероидов из HF : HUVEC значительно выше, чем для двух других типов сфероидов, поскольку они отражают только цитотоксическую активность исследуемых препаратов. Наибольший разрыв в значениях IC_{50} между сфероидами, содержащими и не содержащими опухолевые клетки, наблюдается для оксалиплатина, винкристина и гемцитабина.

Сравнительный анализ динамики роста опухолей при трансплантации клеток и сфероидов из PANC-1 иммунодефицитным мышам. Для создания перевиваемых опухолевых моделей эквивалентные количества PANC-1, находящиеся в виде клеточной суспензии и в составе 1-дневных сфероидов, были подкожно трансплантированы мышам Balb/c nude, после чего была изучена динамика роста опухолей. На 8 сут после трансплантации материалы опухолевые узлы пальпировались у всех животных в группе

Таблица 1. Оценка активности противоопухолевых препаратов на сфероиде из PANC-1, PANC-1 : HF : HUVEC и HF : HUVEC

Соединение	$IC_{50} \pm SD$, мкМ			<i>p</i> -значение*		
	PANC-1	PANC-1 : HF : HUVEC	HF : HUVEC	PANC-1 vs PANC-1 : HF : HUVEC	PANC-1 vs HF : HUVEC	PANC-1 : HF : HUVEC vs HF : HUVEC
Доксорубицин	0.15 ± 0.01	0.071 ± 0.001	0.61 ± 0.28	ns	<0.001	<0.001
Цисплатин	369 ± 126	229 ± 110	2458 ± 1016	ns	<0.001	<0.001
Фторурацил	12.1 ± 1.7	10.5 ± 1.7	519 ± 123	ns	<0.0001	<0.0001
Этопозид	3.6 ± 1.6	1.3 ± 0.8	104 ± 12	ns	<0.0001	<0.0001
Оксалиплатин	1.5 ± 0.2	0.96 ± 0.15	112 ± 15	ns	<0.0001	<0.0001
Циклофосфамид	866 ± 118	120 ± 10	3427 ± 1130	ns	<0.0001	<0.0001
Винкристин	0.0023 ± 0.0003	0.0016 ± 0.0002	>10	<0.001	<0.0001	<0.0001
Гемцитабин	0.0082 ± 0.0016	0.0071 ± 0.0010	5.6 ± 1.2	ns	<0.0001	<0.0001

* Для сравнения количественных признаков в группах применяли одновариантный дисперсионный анализ ANOVA с post hoc тестом Тьюки. ns (non significant) – статистически незначимое различие между значениями IC_{50} .

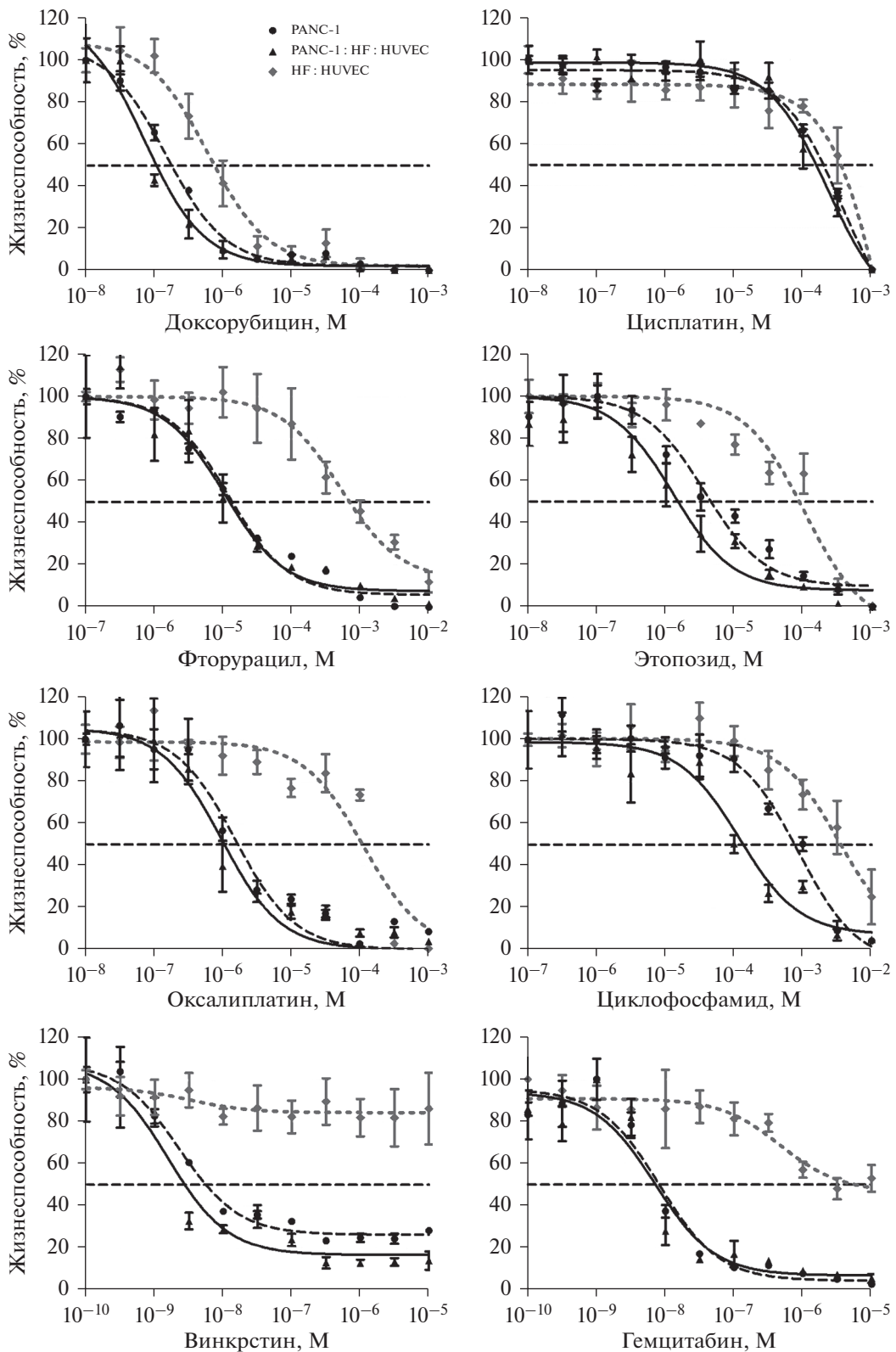


Рис. 2. Кривые зависимости жизнеспособности сфероидов из PANC-1, PANC-1 : HF : HUVEC и HF : HUVEC от концентрации противоопухолевых препаратов. Штриховая кривая (кружки) – сфероиды из PANC-1, сплошная кривая (треугольники) – сфероиды из PANC-1 : HF : HUVEC, штриховая кривая (ромбы) – сфероиды из HF : HUVEC. Показаны средние значения \pm SEM, $n = 4$.

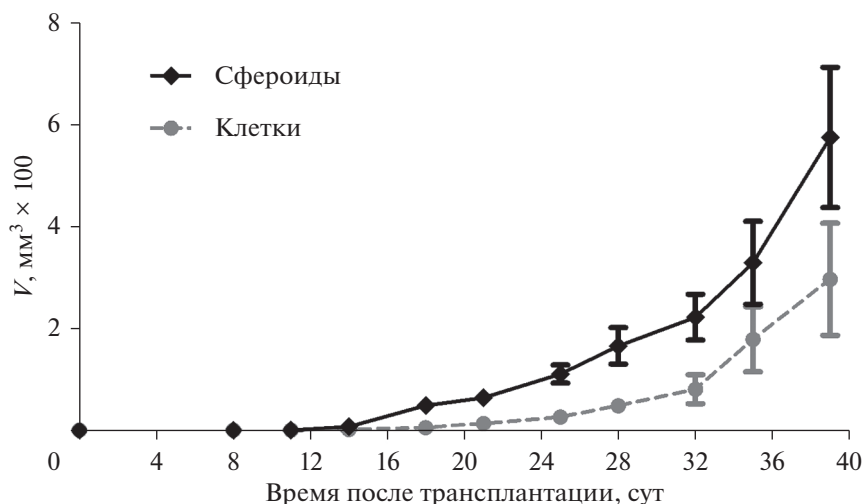


Рис. 3. Динамика роста объемов (V) подкожных ксенографтов из клеток и сфероидов из PANC-1 у мышей-самок Balb/c nude. Штриховая кривая (кружки) – клетки, сплошная (ромбы) – сфероиды. Показаны средние значения \pm SEM, $n = 4$. Для точек 18, 21, 25, 28 и 32 сут различия между объемами опухолей для клеток и сфероидов достоверны ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

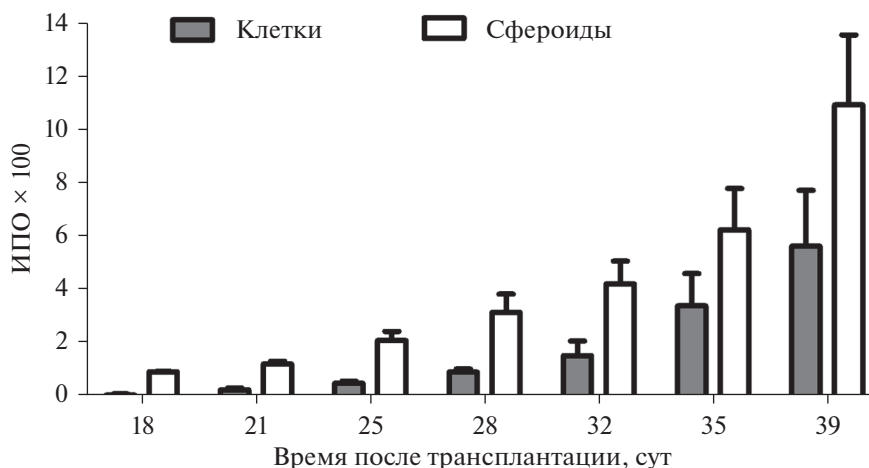


Рис. 4. Зависимость индекса прироста опухоли (ИПО) от времени для клеток и сфероидов из PANC-1 при подкожной трансплантации мышам-самкам Balb/c nude. Серые столбцы – клетки, белые столбцы – сфероиды. Показаны средние значения \pm SEM, $n = 4$. Для точек 18, 21, 25, 28 и 32 сут различия между ИПО для клеток и сфероидов достоверны ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

со сфероидами, и только у 50% животных в группе с клетками. В группе мышей с клетками наблюдали более длительную латентную фазу роста, составляющую 25 сут, по сравнению с группой со сфероидами, в которой латентная фаза была равна 18 сут (рис. 3). Индекс прироста опухоли (ИПО) на 18 сут для клеток составил 9.7, а для сфероидов – 92.7 (рис. 4). К концу наблюдения ИПО для сфероидов был в 2 раза выше по сравнению с ИПО для клеток, составляя 1095 против 564 соответственно. Таким образом, динамика роста опухоли при подкожной трансплантации сфероидов из PANC-1 отличается более корот-

кой латентной фазой и высокой скоростью в экспоненциальной фазе по сравнению с трансплантацией клеток в виде суспензии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сфероиды находят все более широкое применение в качестве *in vitro* моделей для тестирования противоопухолевых препаратов. Создание гетеросфероидов из нескольких типов клеток открывает возможности для гораздо более точного воссоздания структуры опухоли, чем в случае гомосфероидов.

Существует большое количество работ, подчеркивающих важность использования именно таких гетеросфероидов для исследований. Однако работы, в которых бы проводилось сравнение активности препаратов на сфероиде, состоящих только из опухолевых клеток и из опухолевых клеток в смеси с другими типами клеток, практически отсутствуют (Lazari et al., 2018).

В настоящей работе проведено сравнение активности восьми противоопухолевых препаратов на сфероиде из клеток рака поджелудочной железы PANC-1 и смешанных сфероиде из PANC-1 : HF : HUVEC. Исходное суммарное количество клеток в сфероиде было равно 250 клеток и подобрано таким образом, чтобы на момент добавления препаратов диаметр всех сфероидов не превышал 300 мкм и допускал полное проникновение препаратов внутрь сфероидов.

Полученные результаты продемонстрировали, что активность препаратов на двух типах сфероидов практически не различалась. Наблюдали незначительное и статистически недостоверное увеличение активности на сфероиде, состоящих из PANC-1 : HF : HUVEC, по сравнению со сфероиде из PANC-1. Такое увеличение активности скорее связано с разницей в диаметрах гомо- и гетеросфероидов, нежели с их разным составом. В конце инкубации с противоопухолевыми препаратами диаметр контрольных сфероидов составлял 455 ± 27 и 274 ± 17 мкм для PANC-1 и PANC-1 : HF : HUVEC соответственно.

Для оценки цитотоксической активности препаратов было проведено их тестирование на гетеросфероиде из HF : HUVEC. Было установлено, что наибольший разрыв между суммарной (антипролиферативной и цитотоксической) и чистой цитотоксической активностью препаратов наблюдался для оксалиплатина, гемцитабина и винкристина. Важно отметить, что именно оксалиплатин и гемцитабин являются классическими препаратами для лечения рака поджелудочной железы. Наиболее интересный результат был получен для винкристина. Данный препарат проявил самую высокую суммарную активность, при этом он не демонстрировал цитотоксической активности в концентрации 10 мкМ и ниже. Наши данные по суммарной активности оксалиплатина, гемцитабина и винкристина на сфероиде из PANC-1 хорошо согласуются с результатами работ других авторов (Melisi et al., 2011; Bhagwandin et al., 2016), в которых оценивали активность тех же препаратов на монослое клеток.

Сравнительный анализ динамики роста подкожных ксенографтов из клеток и сфероидов из PANC-1 показал, что сфероиды, трансплантированные подкожно, обладают более стабильным и быстрым темпом роста по сравнению с суспензией клеток. Высокая скорость роста сфероидов из PANC-1, вероятно, связана с более сложной структурой и микроокруже-

нием, что позволяет им быстро адаптироваться и расти в условиях *in vivo*. Ранее было показано, что более тесное взаимодействие клеток в сфероиде из PANC-1 по сравнению с 2D-культурой способствует более активному экзосомному межклеточному транспорту веществ, в том числе белка глипикана-1 и ряда микроРНК, являющихся маркерами более агрессивного роста рака поджелудочной железы (Tu et al., 2021).

Таким образом, в настоящей работе проведено тестирование восьми противоопухолевых препаратов на гомосфероиде из PANC-1 и гетеросфероиде из PANC-1, HF и HUVEC. Согласно полученным данным, препараты проявляли одинаковую активность на гомо- и гетеросфероиде, свидетельствующую о том, что добавление дополнительных типов клеток к опухолевым клеткам не является необходимым требованием при тестировании и не оказывает значительного влияния на результаты исследования. Важно подчеркнуть, что для получения интерпретируемых результатов необходимо использовать сфероиды маленького диаметра, допускающего полное проникновение тестируемых препаратов внутрь сфероиде. Также показано, что подкожная трансплантация опухолевых сфероидов из PANC-1 иммунодефицитным мышам приводит к более раннему и быстрому росту опухоли по сравнению с трансплантацией клеток в суспензии. Можно предположить, что описанный метод создания перевиваемой *in vivo* модели путем подкожной трансплантации сфероидов позволит получать опухоли у иммунодефицитных мышей в тех случаях, когда трансплантация клеточной суспензии не является эффективной.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена за счет собственных средств Лаборатории биотехнологических исследований “3Д Биопринтинг Солюшенс”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и (или) институциональные принципы ухода и использования животных в эксперименте были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Балалаева И.В., Соколова Е.А., Пужихина А.Д., Брилкина А.А., Деев С.М. 2017. Сфероиды HER2-положительной аденокарциномы молочной железы человека как модель для тестирования противоопухолевых иммунотоксинов. Acta Naturae. Т. 9. № 1. С. 38. (Balalaeva I.V., Sokolova E.A., Puzhikhina A.D., Brilkina A.A., Deyev S.M. 2017. Spheroids of HER2-positive breast adenocarcinoma for studying anticancer immunotoxins in vitro. Acta Naturae. V. 9. № 1. P. 38.)

- Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. 2002. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика. Т. 1. С. 58. (Bolshevik O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. 2002. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. Kachestvennaya klinicheskaya praktika. V. 1. P. 58.)
- Кудан Е.В., Кудан С.П., Каршиева С.Ш., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А., Буланова Е.А. 2021. Определение активности цитостатиков в 3D условиях культивирования в сравнении с монослойной культурой. Цитология. Т. 63. № 3. С. 244. (Koudan E.V., Kudan S.P., Karshieva S.Sh., Khesuani Yu.D., Mironov V.A., Bulanova E.A. 2021. The determination of cytostatic activity on a 3D spheroids-based model in comparison with conventional monolayer culture. Tsitologiya. V. 63. № 3. P. 244.)
- Тригуб М.М., Филатова Н.В., Арешидзе Д.А., Сень В.Д., Терентьев А.А. 2019. Сравнение действия комплексов платины(IV) на сфероиды и монослойную культуру клеток HeLa. Клеточные технол. биол. мед. № 4. С. 273. (Trigub M.M., Filatova N.V., Areshidze D.A., Sen' V.D., Terentiev A.A. 2019. Comparison of the effect of platinum(IV) complexes on spheroids and monolayer culture of HeLa cells. Bull. Exp. Biol. Med. № 4. P. 273.)
- Akasov R., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Leko M., Dontenwill M., Chipper M., Vandamme T., Markvicheva E. 2016. Formation of multicellular tumor spheroids induced by cyclic RGD-peptides and use for anticancer drug testing *in vitro*. Int. J. Pharm. V. 506. P. 148.
- Bhagwandin V.J., Bishop J.M., Wright W.E., Shay J.W. 2016. The metastatic potential and chemoresistance of human pancreatic cancer Stem cells. PLoS One. V. 11. P. e0148807.
- Brajša K., Trzun M., Zlatar I., Jelić D. 2016a. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. Period. Boil. V. 118. P. 59.
- Brajša K., Vujasinović I., Jelić D., Trzun M., Zlatar I., Karminski-Zamola G., Hranjec M. 2016b. Antitumor activity of amidino-substituted benzimidazole and benzimidazo[1,2-a]quinoline derivatives tested in 2D and 3D cell culture systems. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. V. 31. P. 1139.
- Fang Y., Eglan R.M. 2017. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. SLAS Discovery. V. 22. P. 456.
- Frankel A., Man S., Elliott P., Adams J., Kerbel R.S. 2000. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. Clin. Cancer Res. V. 6. P. 3719.
- Hoffmann O.I., Ilmberger C., Magosch S., Joka M., Jauch K.W., Mayer B. 2015. Impact of the spheroid model complexity on drug response. J. Biotechnol. V. 205. P. 14.
- Hu J.X., Zhao C.F., Chen W.B., Liu Q.C., Li Q.W., Lin Y.Y., Gao F. 2021. Pancreatic cancer: A review of epidemiology, trend, and risk factors. World J. Gastroenterol. V. 27. P. 4298.
- Kinney M.A., Hookway T.A., Wang Y., McDevitt T.C. 2014. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. Ann. Biomed. Eng. V. 42. P. 352.
- Lazzari G., Nicolas V., Matsusaki M., Akashi M., Couvreur P., Mura S. 2018. Multicellular spheroid based on a triple coculture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. Acta Biomater. V. 78. P. 296.
- Liao J., Qian F., Tchabo N., Mhaweche-Fauceglia P., Beck A., Qian Z., Wang X., Huss W.J., Lele S.B., Morrison C.D., Odunsi K. 2014. Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism. PLoS One. V. 9. P. e84941.
- Melisi D., Xia Q., Paradiso G., Ling J., Moccia T., Carbone C., Budillon A., Abbruzzese J.L., Chiao P.J. 2011. Modulation of pancreatic cancer chemoresistance by inhibition of TAK1. J. Natl. Cancer Inst. V. 103. P. 1190.
- Tu J., Luo X., Liu H., Zhang J., He M. 2021. Cancer spheroids derived exosomes reveal more molecular features relevant to progressed cancer. Biochem. Biophys. Rep. V. 26. P. 101026.
- Uematsu N., Zhao Y., Kiyomi A., Yuan B.O., Onda K., Tanaka S., Sugiyama K., Sugiura M., Takagi N., Hayakawa A., Hirano T. 2018. Chemo-sensitivity of two-dimensional monolayer and three-dimensional spheroid of breast cancer MCF-7 cells to daunorubicin, docetaxel, and arsenic disulfide. Anticancer Res. V. 38. P. 2101.
- Weigelt B., Lo AT, Park C.C., Gray J.W., Bissell M.J. 2010. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. Breast Cancer Res. Treat. V. 122. P. 35.

The Use of PANC-1 Spheroids for Testing Antitumor Drugs *In Vitro* and Creating a Tumor Model *In Vivo*

S. Sh. Karshieva^{a, b}, S. P. Kudan^c, Y. D. Khesuani^a, V. S. Pokrovsky^b, V. A. Mironov^{a, d}, and E. V. Koudan^{a, *}

^aLaboratory for Biotechnological Research 3D Bioprinting Solutions, Moscow, 115409 Russia

^bBlokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, 115478 Russia

^cPablo Neruda School №1568, Moscow, 127221 Russia

^dSechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

*e-mail: koudan1980@gmail.com

Recently, spheroids have attracted widespread attention of researchers as 3D models for drug testing. One of the key features of spheroids is that they can be composed of one or several types of cells. There is a hypothesis that the use of heterospheroids from different types of cells in testing anticancer drugs can better reproduce the 3D architecture

of the tumor and, as a consequence, increase the predictiveness of the research. To verify this hypothesis, in this study, we tested the activity of eight anticancer drugs on homo-spheroids consisting of pancreatic cancer cells (PANC-1) and heterospheroids consisting of a triple co-culture of PANC-1, primary human fibroblasts and endothelial cells (HUVEC). It was found that the use of heterospheroids from several types of cells, which more accurately reflect the heterogeneous tumor microenvironment, does not lead to a noticeable change in the activity of the drugs. Also, we subcutaneously transplanted spheroids from PANC-1 to immunodeficient mice. Our data demonstrated that the obtained tumor model reproduce a more aggressive phenotype of human pancreatic cancer compared to cell transplantation in suspension.

Keywords: spheroids, antitumor drugs, antiproliferative activity, cytotoxicity, tumor model