

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

УДК 576.5

doi: 10.26907/2542-064X.2021.2.155-176

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДОКЛИНИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК

К.В. Китаева, А.А. Ризванов, В.В. Соловьева

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

На сегодняшний день в мире существует проблема проведения рационального первичного скрининга веществ, обладающих противоопухолевой активностью. Низкая корреляция между *in vitro* и *in vivo* исследованиями с клиническими испытаниями остается серьезной проблемой. Выбор правильной модели опухоли на стадии тестирования *in vitro* обеспечивает снижение финансовых и временных затрат на поиск и испытание перспективных противоопухолевых агентов. Разработка новых подходов к скринингу противоопухолевых препаратов является весьма актуальной задачей в свете растущей распространенности онкологических заболеваний, и, как следствие, необходимости увеличения темпов создания, разработки и тестирования новых противоопухолевых агентов. Хотя фармацевтическая промышленность использует преимущественно двумерные модели *in vitro*, основанные на коммерческих линиях опухолевых клеток, в области доклинического скрининга возникает все больше запросов на более сложные модели, такие как трехмерные модели (в том числе органоиды), микрофлюидные системы, камера Бойдена, а также модели, созданные с использованием трехмерной биопечати. Нами проведен обзор вышеперечисленных *in vitro* моделей опухолей, в том числе их использования в исследованиях и характеристик, для того чтобы дать представление ученым и клиницистам из разных областей, включая фармацию, доклинические исследования и клеточную биологию, о скрининге потенциальных противоопухолевых препаратов с их применением.

Ключевые слова: скрининг противоопухолевых препаратов, *in vitro* модель опухоли, двумерная культура, трехмерная культура, микрофлюидная система, камера Бойдена, микроокружение опухоли, 3D-биопечать

Введение

Число пациентов с онкологическими заболеваниями увеличивается во всем мире, и одной из наиболее важных проблем остается проблема разработки эффективных, безопасных и экономичных противоопухолевых препаратов. За период с 2006 по 2015 г. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (англ. Food and Drug Administration, FDA) среди начавших доклинические испытания потенциальных противоопухолевых агентов было одобрено только 5.1% препаратов [1, 2]. Учитывая высокую стоимость и длительность клинической разработки противоопухолевых лекарственных средств необходима разработка новых эффективных доклинических платформ для скрининга веществ с потенциальной противоопухолевой активностью [3].

Модели опухоли *in vitro* являются необходимым инструментом как для поиска новых веществ с противоопухолевой активностью, так и для исследования их эффективности. Реалистичные *in vitro* модели опухолей позволяют проводить более детальный первичный скрининг потенциальных противоопухолевых препаратов, не допуская препараты с недостаточной противоопухолевой активностью к доклиническим испытаниям на животных. Тестирование препаратов на животных моделях проводится для оценки биодоступности исследуемого вещества, токсичности в определенных дозах и терапевтической эффективности [4]. Согласно нормам, любые новые лекарственные средства должны проходить доклинические испытания на животных моделях, прежде чем быть допущенными до клинических испытаний на людях. Однако использование животных моделей вызывает ряд проблем, в число которых входит высокая стоимость, разница в ответе на препарат из-за межвидовых, а также внутривидовых индивидуальных физиологических различий животных, ограниченная доступность и выполнимость [5, 6]. Таким образом, актуальной проблемой является создание более высокотехнологичных моделей *in vitro* для оценки терапевтической эффективности противоопухолевых лекарственных препаратов [7].

1. Взаимодействие опухоли и организма

Поведение опухоли в организме определяется как опухолевыми клетками, так и клетками стромального микроокружения опухоли и внеклеточным матриксом (ВМ), который обеспечивает структурную поддержку клеток во внеклеточном пространстве [8]. Опухоль по своим биологическим характеристикам аналогична хронически незаживающей ране с постоянным воспалением, которое способствует онкогенезу, прогрессированию и метастазированию опухоли. Микроокружение опухоли характеризуется наличием большого количества воспалительных цитокинов, факторов роста и других факторов, поддерживающих рост и метастазирование опухоли [9].

Микроокружение опухоли включает следующие воспалительные цитокины: фактор некроза опухоли (англ. tumor necrosis factor α , TNF- α) [10], интерферон-гамма (англ. interferon γ , IFN- γ) [11], интерлейкины (IL) 1, 6 и 8 [12–14] и трансформирующий фактор роста-бета (англ. transforming growth factor β , TGF- β) [15]. В микроокружении опухоли также присутствуют фактор роста гепатоцитов (англ. hepatocyte growth factor, HGF), тромбоцитарный фактор роста (англ. platelet-derived growth factor, PDGF), эндотелиальный сосудистый фактор роста (англ. vascular endothelial growth factor, VEGF) и фактор стромальных клеток (англ. stromal cell-derived factor, SDF-1) [16].

Привлекаемые опухолью стромальные и другие типы клеток играют ключевую роль не только в прогрессировании и метастазировании, но и в формировании резистентности к терапии [17]. Микроокружение опухоли состоит из множества клеточных компонентов, включающих иммунные клетки (Т-лимфоциты, В-лимфоциты, нейтрофилы, натуральные киллеры (NK-клетки), макрофаги), эндотелиальные клетки, ассоциированные с опухолью фибробласты и миофибробласты, адипоциты, перициты и мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) [8].

Опухолевые клетки секретируют множество факторов, влияющих на дифференцировку окружающих клеток – VEGF: гранулоцитарно-макрофагальный

колониестимулирующий фактор (англ. colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage), GM-CSF), колониестимулирующий фактор макрофагов (англ. macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), IL-10, IL-6, ганглиозиды, простагландины, TGF- β и др. [18]. Стромальные клетки и фибробласты в микроокружении опухоли также секретируют факторы роста и хемокины (например, HGF, фактор роста фибробластов (англ. fibroblast growth factor 2, FGF2) и SDF-1), которые не только поддерживают рост и выживание злокачественных клеток, но и функционируют как хемоаттрактанты, стимулирующие миграцию других клеток в опухоль [19]. МСК участвуют в каждом этапе развития опухоли: это избегание иммунологического надзора, стимулирование ангиогенеза опухоли, развитие устойчивости к терапии, инвазия и метастазирование, а также индукция перехода опухолевых клеток в низкодифференцированное состояние и образование стволовых опухолевых клеток [20]. Не меньший интерес представляет взаимодействие между иммунными клетками и опухолевыми клетками из-за двойственной роли иммунных клеток и продуцируемых ими факторов. Иммунные реакции предотвращают и ингибируют развитие опухоли, тем не менее последние данные свидетельствуют о том, что иммунные клетки в микроокружении опухоли тесно взаимодействуют с трансформированными злокачественными клетками, способствуя онкогенезу [21].

Важным компонентом микроокружения опухоли является ВМ, состоящий из компонентов с различными физическими и биохимическими свойствами, включая белки, гликопротеины, протеогликаны и полисахариды [22]. Внеклеточный матрикс не только обеспечивает физическую поддержку для клеток микроокружения опухоли, но и является источником ключевых факторов роста. Известно, что на поздних стадиях прогрессирования опухоли происходит дезорганизация внеклеточного матрикса. Последний модулирует поведение стромальных клеток в микроокружении опухоли, что приводит к индукции воспалительных реакций и росту новых кровеносных сосудов [23].

Кровеносные сосуды опухоли отличаются неровным просветом, они имеют меньшую плотность стенок и аномально извилисты [24]. Подобные характеристики обусловлены аномально высокой скоростью пролиферации эндотелиальных клеток, чувствительных к высокому уровню продукции VEGF опухолевыми клетками [25]. Такая организация кровеносной сетки приводит к неравномерному распределению давления в сосудах, следствием чего являются их разрывы. Неравномерное распределение питательных веществ и кислорода приводит к формированию бедной, гипоксической среды – одной из ключевых характеристик опухолей [26]. В условиях гипоксии опухолевые клетки потребляют глюкозу и выделяют лактат, который способствует снижению pH в близлежащих участках. В свою очередь, недостаток глюкозы и ацидоз увеличивают стабильность посттранскрипционной мРНК гена *VEGFA* в опухолевых клетках, что способствует индукции ангиогенеза [27]. Таким образом, исследование опухоли как сложноорганизованной среды способно внести серьезный вклад в повышение качества лечения онкологических заболеваний, разработку новых методов диагностики и терапии с персонализированным подходом [28–30] и создание новых реалистических моделей опухолей для эффективного скрининга новых веществ с потенциальной противоопухолевой активностью.

2. Моделирование процессов карциогенеза для изучения особенностей роста опухоли и скрининга противоопухолевых лекарственных препаратов

2.1. Двумерные культуры. До 80-х годов XX в. Национальный институт онкологии США (англ. National Cancer Institute, NCI) для систематического скрининга лекарственных средств использовал *in vivo* модели мышей с лейкемией (клеточные линии P388 или L1210В) [31], которые обладали высокой производительностью, стабильностью, были удобными для интерпретации данных и относительно недорогими. Однако существенным недостатком данных моделей стала неспособность выявлять потенциальные противоопухолевые вещества, направленные на лечение солидных опухолей. Данный недостаток был учтен, и уже к концу 80-х годов была разработана *in vitro* панель для скрининга лекарственных препаратов, состоящая из 60 различных клеточных линий человека опухолевого происхождения (лейкоз, меланома, опухоли центральной нервной системы, рак легких, толстой кишки, яичников, молочной железы, почки и предстательной железы), получившая название NCI60 (табл. 1) [32].

Тестирование лекарственного препарата с помощью панели NCI60 предполагает использование двумерных (2D) культур опухолевых клеток, культивируемых в монослое на плоской поверхности (рис. 1, а) [33]. На первом этапе скрининга тестирование проводят на трех клеточных линиях, являющихся наиболее чувствительными к лекарственной терапии: MCF7 (аденокарцинома молочной железы), NCI-H460 (карцинома легких) и SF-268 (глиома) [34]. Цитотоксичность исследуемого вещества определяют с использованием розового анионного красителя сульфородамина В. Если исследуемое вещество подавляет рост по крайней мере одной клеточной линии, оно переходит на следующий этап тестирования на полной панели из 60 клеточных линий [32].

В 2017 г. на основе результатов скрининга на панели NCI60 создана база данных NCI ALMANAC (<https://dtp.cancer.gov/ncialmanac>), благодаря которой были выявлены новые эффективные комбинации существующих противоопухолевых препаратов и начаты новые клинические испытания [35].

С помощью панели NCI60 были открыты противоопухолевые свойства бортезомида (PS-341), препарата для лечения миеломы [36], а также протестированы аналоги 2-нафталиновых стильбенов и цианостильбенов на предмет противоопухолевой активности. Показано, что эти соединения обладали наибольшей активностью в отношении опухолевых линий COLO 205, SF-295, SF-539, SK-MEL-5, MDA-MB-435, UACC-62 и MV4-11 [37].

По аналогии с панелью NCI60 в 90-е годы Японским фондом исследования рака (англ. Japanese Foundation for Cancer Research, JFCR) была разработана панель, состоящая из 30 линий опухолевых клеток панели NCI60, а также включающая в себя 9 опухолевых линий клеток, специфичных для населения Японии: клетки рака желудка (St-4, MKN-1, MKN-7, MKN-28, MKN-45 и MKN-74) и клетки рака молочной железы (HBC-4, HBC-5 и BSY-1). Таким образом, панель включала в себя 39 клеточных линий и получила название JFCR39 [38]. Данная модель также оказалась весьма удобным инструментом для поиска противоопухолевых агентов и мишеней, таких как MS-247, FJ5002, ZSTK474 [39].

Табл. 1

Перечень клеточных линий панели NCI60 (нет ссылки в тексте на таблицу, нужно дать)

Линия клеток	Тип опухоли	Линия клеток	Тип опухоли
CCRF-CEM HL-60(TB) K-562 MOLT-4 RPMI-8226 SR	Лейкоз	786-0 A498 ACHN CAKI-1 RXF 393 SN12C	Рак почки
SF-268 SF-295 SF-539 SNB-19 SNB-75 U251	Опухоли центральной нервной системы	TK-10 UO-31	
A549/ATCC EKVX HOP-62 HOP-92 NCI-H226 NCI-H23 NCI-H322M NCI-H460 NCI-H522	Рак легких	PC-3 DU-145	Рак предстательной железы
LOX IMVI MALME-3M M14 MDA-MB-435 SK-MEL-2 SK-MEL-28 SK-MEL-5 UACC-257 UACC-62	Меланома	COLO 205 HCC-2998 HCT-116 HCT-15 HT29 KM12 SW-620	Рак толстой кишки
		IGR-OV1 OVCAR-3 OVCAR-4 OVCAR-5 OVCAR-8 NCI/ADR-RES SK-OV-3	Рак яичников
		MCF7 MDA-MB-231/ATCC MDA-MB-468 HS 578T BT-549 T-47D	Рак молочной железы

Однако в ходе клинических испытаний становится очевидным, что лекарственные средства, показавшие высокую эффективность в экспериментах на 2D-моделях *in vitro*, не имеют эффективности или имеют слабую эффективность у реальных пациентов с онкологией [40]. Частично это явление объясняется тем фактом, что клетки, выращенные в 2D-культуре, не имеют сложной трехмерной архитектуры ткани и не отражают сложных взаимодействий между клетками опухолевого микроокружения или ВМ, которые существуют в организме [41].

2.2. Трехмерные культуры. Известно, что 2D-культуры не в полной мере отражают патофизиологию опухолевых клеток и действительный уровень устойчивости к радиотерапии или химиопрепаратам в опухолевой нише в системе *in vivo* [42]. Исследования показали, что профили экспрессии генов, а также ответы на лечение в многоклеточных сфероидных 3D-моделях более сходны с ситуацией *in vivo* [43].

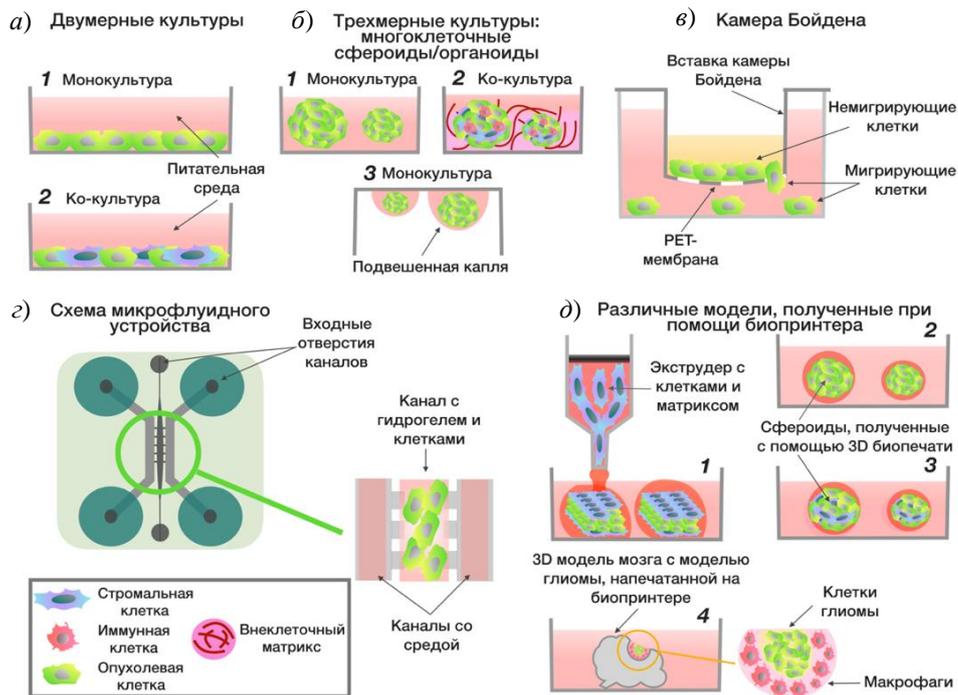


Рис. 1. Тест-системы для скрининга противоопухолевых лекарственных препаратов: а) 2D-культуры: 1 – монослой опухолевых клеток, 2 – ко-культура из опухолевых и стромальных клеток; б) 3D-модели многоклеточных сфероидов: 1 – сфероиды, состоящие из опухолевых клеток, 2 – модель стромы опухоли, основанная на ко-культивировании нескольких типов клеток на модели ВМ, 3 – сфероиды, созданные методом висячих капель; в) камера Бойдена для анализа клеточной миграции: клетки с высоким инвазивным потенциалом проходят через пористую полупроницаемую мембрану; г) микрофлюидная система для оценки инвазивного потенциала опухолевых клеток: смесь гидрогеля и клеток помещается в центральный канал, в боковые каналы помещается среда, содержащая/лишенная факторов в зависимости от цели эксперимента; д) модели опухоли, созданные при помощи биопечати: 1 – слой опухолевых клеток, расположенный между слоями стромальных клеток, 2 – сфероиды, состоящие из опухолевых клеток, 3 – сфероиды, моделирующие опухолевую строму, состоящие из опухолевых клеток, смешанных со стромальными клетками, 4 – модель глиомы, представляющая собой 3D-модель мозга с введенными в нее клетками глиомы и макрофагами

Например, опухолевые клетки печени в 3D-культуре обладают высокой резистентностью к медикаментозному лечению, сходной с устойчивостью солидных опухолей *in vivo* [44]. Так, клеточные линии ВТ-549, ВТ-474 и Т-47D, культивируемые в виде сфероидов (рис. 1, б), проявляли большую устойчивость к паклитакселу и доксорубицину по сравнению с клетками в 2D-культуре [3]. Показано, что клетки плоскоклеточного рака головы и шеи линий LK0902, LK0917 и LK1108, культивируемые в виде сфероидов, были менее чувствительны к цисплатину по сравнению с 2D-культурами. В клеточных линиях LK0917 и LK1108 также наблюдалась устойчивость к цетуксимабу, опосредованная культивированием в виде сфероидов [45]. Клетки рака толстой кишки, культивируемые в виде сфероидов, демонстрировали большую устойчивость в ответ

на ингибирование пути АКТ-mTOR-S6K или митоген-активируемой протеинкиназы (англ. mitogen-activated protein kinase, MAPK) по сравнению с клетками, культивируемыми в виде 2D-культуры. Ингибирование пути АКТ-mTOR-S6K приводило к повышенному фосфорилированию киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (англ. extracellular signal-regulated kinase, ERK) в 2D-культуре, тогда как передача сигналов ERK снижалась у сфероидов [43].

Известно, что микроокружение опухолевых клеток может заметно изменить восприимчивость опухолевых клеток к лекарственным препаратам. Для решения этой задачи были разработаны новые методы культивирования клеток с использованием ВМ для моделирования пространственной организации, а также с добавлением в культуру различных типов клеток, входящих в микроокружение опухоли [46]. Цель этих методов состоит в том, чтобы реконструировать трехмерную модель многоклеточной опухоли, которая сможет стать переходным звеном между 2D-моделями *in vitro* и тестированием на животных *in vivo*. Наличие ВМ в 3D-культурах необходимо для моделирования межклеточных взаимодействий, включая целевые контакты, которые обеспечивают коммуникацию и обмен веществ, таких как ионы и другие небольшие молекулы. Кроме того, в 3D-культурах отмечена повышенная экспрессия молекул клеточной адгезии, таких как N-кадгерин и E-кадгерин, которые помогают в передаче сигналов между клетками [47]. Описано, что использование ламинин-обогащенного ВМ повышает устойчивость клеток колоректального рака линий SW-480, HT-29, DLD-1, LOVO, CACO-2, COLO-205 и COLO-206F к ингибитору рецептора эпидермального фактора роста (англ. epidermal growth factor receptor, EGFR) [48]. При культивировании клеток линий HCT-116, SW-620 и DLD-1 в виде сфероидов или в ко-культуре с фибробластами и эндотелиальными клетками повышается их устойчивость к препаратам 5-фторурацил, регорафениб и эрлотиниб [49]. Кроме того, показано, что совместно культивируемые клетки немелкоклеточного рака легкого и фибробласты в трехмерных матриксах, представляющих собой Матригель или альгинат, могут быть использованы в качестве моделей для анализа инфильтрации иммунных клеток при тестировании препаратов [50]. Кроме того, описана модель для высокопроизводительного скрининга лекарственных препаратов, состоящая из клеточных линий протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (Panc-1 и VxPC-3) и опухоль-ассоциированных фибробластов, окруженных олигомерным коллагеном типа I для создания микроокружения опухоли [51].

Одной из альтернатив в создании трехмерной модели опухолевой ткани является метод получения опухолевых органоидов. Органоиды могут формировать два основных типа стволовых клеток: плюрипотентные стволовые клетки (эмбриональные или индуцированные) и стволовые клетки, выделенные из различных органов и тканей взрослого организма [52]. Органоиды получают путем культивирования небольших фрагментов ткани и эксплантов на матрицах, а также из культивируемых или отсортированных клеток, которые формируют органоиды в культуре *in vitro* [53]. Показано, что органоиды из тканей первичного рака легкого проявляли высокую репродукцию гистологических и генетических характеристик ткани *in situ*, что позволило их использовать для персонализированного подбора лекарственных препаратов для пациентов [54]. Метод получения органоидов также использовали для моделирования протоковой аденокарциномы

поджелудочной железы [55] и метастатического рака предстательной железы [56]. На органоидах, полученных от пациентов с раком мочевого пузыря, были протестированы препараты эпирубицин, митомицин С, гемцитабин, винкристин, доксорубицин и цисплатин, в результате чего была подтверждена высокая применимость этой модели в качестве перспективной модели рака мочевого пузыря человека [57] (рис. 1, б).

Таким образом, трехмерная культура может быть мощным инструментом в исследованиях опухолей и скрининге потенциальных противоопухолевых препаратов [58].

2.3. Камера Бойдена. Камера Бойдена представляет собой камеру, состоящую из двух отделений, заполненных средой и разделенных между собой микропористой мембраной (рис. 1, в) [59]. Камера Бойдена является удобным инструментом для исследования хемотаксиса, оценки подвижности клеток и инвазии. Так, камера Бойдена была использована для оценки подвижности клеток в исследовании о влиянии свободного паклитаксела и загруженных паклитакселом пиромеллитовых наностержней на снижение роста и инвазивности клеток меланомы [60]. А. Вессели с соавторами применили камеру Бойдена для оценки и сравнения инвазивной активности сфероидов, содержащих только опухолевые клетки, и сфероидов, содержащих смесь опухолевых и стволовых клеток [61]. В другом исследовании изучали адгезию и цитоскелетную миграцию клеток фибросаркомы HT1080 и звездчатых клеток печени линии LX2 в трехмерной системе, используя фибронектин, Матригель и коллаген I типа в качестве хемоаттрактантов [62]. Однако, несмотря на удобство использования камеры Бойдена, исследователи все чаще обращаются к более продвинутым системам, реалистично имитирующим микроокружение опухоли, в частности к микрофлюидным системам.

2.4. Микрофлюидные системы. Микрофлюидные системы представляют собой перспективные модели для воссоздания миграции, микроокружения и микроциркуляции клеток в опухолевой ткани. Это небольшие устройства, которые способны воспроизвести определенный ток жидкости, постоянную температуру, подачу свежей питательной среды, давление потока и химические градиенты, характерные для систем *in vivo* (рис. 1, г) [63].

Использование микрофлюидной системы в сочетании с коллаген-матригелевыми гидрогелевыми матриксами позволило воспроизвести микроокружение, близкое к реальной опухоли, подходящее для исследования миграции и инвазии клеток аденокарциномы легкого H1299. При этом Матригель в низких концентрациях облегчал миграцию клеток H1299, однако при высокой концентрации он замедлял миграцию клеток, возможно, из-за их чрезмерного прикрепления. Показано также, что применение блокаторов интегрин на основе антител значительно модулировало механизмы миграции клеток H1299 [64]. Описана микрофлюидная система с непрерывной подачей питательной среды через шприцевой насос, используемая для исследования влияния ингибитора матриксных металлопротеиназ (GM6001) на образование инвадоподий у клеток рака легкого A549, характерных для клеток при инвазии [65]. Микрофлюидные системы позволяют также получать метастатическую модель опухоли, например рака молочной железы,

которая позволяет проводить исследование влияния противоопухолевых препаратов на предмет ингибирования миграции опухолевых клеток [66]. Для моделирования процесса экстравазии сконструирована микрофлюидная система, содержащая два микрофлюидных канала и пористую мембрану, зажатую между ними. Первый канал представляет сосудистый эквивалент и содержит первичные эндотелиальные клетки, выделенные из легочной артерии. Второй канал действует как резервуар для сбора мигрирующих опухолевых клеток. При этом эндотелиальные клетки проявляли *in vivo*-подобное поведение в условиях потока. Введенные опухолевые клетки эпителиального или мезенхимного происхождения, экспрессирующие репортерный ген зеленого флуоресцентного белка (англ. green fluorescent protein, GFP), обнаруживались с помощью витальной визуализации, которая показала плотно прикрепленные к эндотелиальной оболочке опухолевые клетки [67].

2.5. Трехмерная биопечать. Одним из видов трехмерных культур является 3D-биопечать, которая позволяет создавать различные каркасы, имитирующие процессы, происходящие в опухолевом микроокружении [68, 69].

Технология 3D-биопечати позволяет создавать стандартизированные тест-системы для скрининга противоопухолевых препаратов [70]. Например, созданная при помощи 3D-биопринтинга модель гепатомы человека оказалась более устойчивой к анти-CD147 моноклональному антителу (метузумаб), чем аналогичная модель, созданная на микрофлюидной системе [71].

Интересным подходом является комбинация нескольких типов клеток, опухолевых и стромальных, в 3D-биопечатной модели (рис. 1, д). Показано, что клетки рака молочной железы и фибробласты, культивируемые в 3D-биопечатных сфероидедах в составе альгинатно-желатинового гидрогеля, сохраняют жизнеспособность свыше 30 дней и проявляют устойчивость к действию паклитаксела, чего не наблюдалось в 3D-биопечатной монокультуре клеток рака молочной железы [72]. Трофическая роль стромальных или иммунных клеток показана и других исследованиях. Наличие МСК в 3D-биопечатной гидрогелевой конструкции поддерживало жизнеспособность клеток рака молочной железы после воздействия доксорубицином [73]. Использование технологии 3D-биопечати позволяет также исследовать поведение иммунных клеток в микроокружении опухоли. Показано, что в 3D-биопечатной модели клетки глиобластомы активно рекрутируют макрофаги и поляризуют их в глиома-ассоциированные макрофаги, которые, в свою очередь, способствуют пролиферации и инвазивности клеток глиобластомы [74]. Описаны 3D-биопечатные модели рака молочной и поджелудочной железы, содержащие стромальный компонент (эпителиальные клетки пупочной вены, фибробласты, МСК) и аналог ВМ. Полученные 3D-биопечатные модели повторяли поведение опухолей *in vivo* и *in situ* [75].

Использование 3D-биопечати позволяет получать конструкции, имитирующие васкуляризацию опухоли. Получена 3D-органотипическая микрофлюидная платформа, интегрированная с гидрогелевыми биоматериалами, для имитации сосудистой ниши стволовых клеток глиомы (СКГ), полученных от пациентов [69]. Показано, что микрососудистая сеть усиливает инвазию, поддерживает скорость пролиферации и классический фенотип СКГ [69]. Описана трехмерная модель

СКГ в составе пористого гидрогеля, содержащего желатин, альгинат и фибриноген. СКГ активно пролиферировали, сохраняли жизнеспособность и биологические свойства (экспрессия нестина, способность к дифференцировке) в полученной 3D-биопечатной модели *in vitro*, а также обладали устойчивостью к цитотоксическому действию темозоломида в отличие от 2D-культуры. Кроме того, отмечено увеличение секреции VEGF в первые три недели культивирования, что указывает на индукцию механизмов ангиогенеза опухоли [76]. Имитировать васкуляризацию опухоли также позволяют 3D-биопечатные капсулы с программируемым выходом VEGF и EGF. Программируемое высвобождение факторов роста позволяет управлять клеточной миграцией и процессом ангиогенеза, благодаря чему можно получить динамическую систему для исследования метастатических процессов [77].

Таким образом, конструкции, полученные с помощью 3D-биопечати, позволяют моделировать различные процессы, происходящие в микроокружении опухоли. Дальнейшие исследования в области 3D-биопечати, стандартизация и валидация разрабатываемых опухолевых моделей, позволят создать высокопроизводительные 3D-модели опухолей как для получения новых фундаментальных знаний о механизмах канцерогенеза, так и для скрининга потенциальных противоопухолевых препаратов и индивидуального подбора лекарственных средств [78].

Заключение

В последние десятилетия доклинические испытания противоопухолевых препаратов претерпели значительные изменения, в частности, большое внимание было уделено модернизации протоколов скрининга клеточных культур. По мере углубления знаний о межклеточных взаимодействиях внутри опухоли возникла необходимость в разработке более сложных и высокотехнологичных моделей. Двумерные культуры (панель NCI60, в частности), несмотря на простоту использования и высокую воспроизводимость, постепенно перестают отвечать на новые запросы в области доклинического скрининга и прецизионной медицины. Трехмерные культуры, представляющие сфероиды и сфероидоподобные образования, выращенные в различных условиях культивирования, частично удовлетворили этот запрос. Трехмерные культуры компенсировали некоторые недостатки двумерных культур, а именно те, которые связаны с межклеточными взаимодействиями и взаимодействиями с внеклеточным каркасом. Однако обычные трехмерные культуры не совсем подходят для оценки влияния противоопухолевых препаратов на такие важные процессы, как миграция, инвазия и хемотаксис; исследования этих сложных процессов требуют использования дополнительных устройств, например чипов в микрофлюидных системах и камеры Бойдена. Одной из тенденций последнего десятилетия стало использование 3D-биопечати, благодаря которой, в теории, можно печатать ткани с желаемой архитектурой с достаточно высоким разрешением. Но данная область исследований также столкнулась с рядом проблем, которые еще предстоит решить. Несмотря на некоторые недостатки существующих методов скрининга, все же они отвечают современным тенденциям в науке и технике, направленным на усложнение существующих методов тестирования, особенно в области доклинического скрининга.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, а также при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00263.

Литература

1. Hay M., Thomas D.W., Craighead J.L., Economides C., Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – V. 32, No 1. – P. 40–51. – doi: 10.1038/nbt.2786.
2. Hobbs B.P., Barata P.C., Kanjanapan Y., Paller C.J., Perlmutter J., Pond G.R., Prowell T.M., Rubin E.H., Seymour L.K., Wages N.A., Yap T.A., Feltquate D., Garrett-Mayer E., Grossman W., Hong D.S., Ivy S.P., Siu L.L., Reeves S.A., Rosner G.L. Seamless designs: Current practice and considerations for early-phase drug development in oncology // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2019. – V. 111, No 2. – P. 118–128. – doi: 10.1093/jnci/djy196.
3. Imamura Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., Kiyota N., Takao S., Kono S., Nakatsura T., Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer // *Oncol. Rep.* – 2015. – V. 33, No 4. – P. 1837–1843. – doi: 10.3892/or.2015.3767.
4. Stevens J.L., Baker T.K. The future of drug safety testing: Expanding the view and narrowing the focus // *Drug Discovery Today.* – 2009. – V. 14, No 3–4. – P. 162–167. – doi: 10.1016/j.drudis.2008.11.009.
5. Bileckot R., Masson C., Ntsiba H., Mbongo J.A., Biendo M., Yala F., Bregeon C. Prospective study of rheumatic manifestations in human immunodeficiency virus infection. Apropos of 26 cases in Congo // *Rev. Rhum. Mal. Osteo-Articulaires.* – 1991. – V. 58, No 3. – P. 163–168.
6. Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., Rutland C.S., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Mouse tumor models for advanced cancer immunotherapy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21, No 11. – Art. 4118, P. 1–15. – doi: 10.3390/ijms21114118.
7. Kitaeva K.V., Rutland C.S., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Cell culture based *in vitro* test systems for anticancer drug screening // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – V. 8. – Art. 322, P. 1–9. – doi: 10.3389/fbioe.2020.00322.
8. Chiantore M.V., Mangino G., Zangrillo M.S., Iuliano M., Affabris E., Fiorucci G., Romeo G. Role of the microenvironment in tumorigenesis: Focus on virus-induced tumors // *Curr. Med. Chem.* – 2015. – V. 22, No 8. – P. 958–974. – doi: 10.2174/0929867322666141212121751.
9. Gal P., Varinska L., Faber L., Novak S., Szabo P., Mitrengova P., Mirossay A., Mucaji P., Smetana K. How signaling molecules regulate tumor microenvironment: Parallels to wound repair // *Molecules.* – 2017. – V. 22, No 11. – Art. 1818, P. 1–17. – doi: 10.3390/molecules22111818.
10. Zhou X., Li Z., Zhou J. Tumor necrosis factor α in the onset and progression of leukemia // *Exp. Hematol.* – 2017. – V. 45. – P. 17–26. – doi: 10.1016/j.exphem.2016.10.005.
11. Kursunel M.A., Esendagli G. The untold story of IFN- γ in cancer biology // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2016. – V. 31. – P. 73–81. – doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.07.005.
12. Song Z., Ren D., Xu X., Wang Y. Molecular cross-talk of IL-6 in tumors and new progress in combined therapy // *Thorac. Cancer.* – 2018. – V. 9, No 6. – P. 669–675. – doi: 10.1111/1759-7714.12633.

13. *Alfaro C., Sanmamed M.F., Rodriguez-Ruiz M.E., Teijeira A., Onate C., Gonzalez A., Ponz M., Schalper K.A., Perez-Gracia J.L., Melero I.* Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up // *Cancer Treat. Rev.* – 2017. – V. 60. – P. 24–31. – doi: 10.1016/j.ctrv.2017.08.004.
14. *Malik A., Kanneganti T.-D.* Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer // *Immunol. Rev.* – 2018. – V. 281, No 1. – P. 124–137. – doi: 10.1111/imr.12615.
15. *Papageorgis P., Stylianopoulos T.* Role of TGF β in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review) // *Int. J. Oncol.* – 2015. – V. 46, No 3. – P. 933–943. – doi: 10.3892/ijo.2015.2816.
16. *Nagarsheth N., Wicha M.S., Zou W.* Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* – 2017. – V. 17, No 9. – P. 559–572. – doi: 10.1038/nri.2017.49.
17. *Wu T., Dai Y.* Tumor microenvironment and therapeutic response // *Cancer Lett.* – 2017. – V. 387. – P. 61–68. – doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.043.
18. *Kusmartsev S., Gabrilovich D.I.* Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer // *Cancer Metastasis Rev.* – 2006. – V. 25, No 3. – P. 323–331. – doi: 10.1007/s10555-006-9002-6.
19. *Hanahan D., Coussens L.M.* Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment // *Cancer Cell.* – 2012. – V. 21, No 3. – P. 309–322. – doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
20. *Sun Z., Wang S., Zhao R.C.* The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment // *J. Hematol. Oncol.* – 2014. – V. 7. – Art. 14, P. 1–10. – doi: 10.1186/1756-8722-7-14.
21. *Payne K.K., Bear H.D., Manjili M.H.* Adoptive cellular therapy of cancer: Exploring innate and adaptive cellular crosstalk to improve anti-tumor efficacy // *Future Oncol.* – 2014. – V. 10, No 10. – P. 1779–1794. – doi: 10.2217/fon.14.97.
22. *Insua-Rodriguez J., Oskarsson T.* The extracellular matrix in breast cancer // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2016. – V. 97. – P. 41–55. – doi: 10.1016/j.addr.2015.12.017.
23. *Trivanovic D., Krstic J., Djordjevic I.O., Mojsilovic S., Santibanez J.F., Bugarski D., Jaukovic A.* The roles of mesenchymal stromal/stem cells in tumor microenvironment associated with inflammation // *Mediators Inflammation.* – 2016. – V. 2016. – Art. 7314016, P. 1–14. – doi: 10.1155/2016/7314016.
24. *Dewhirst M.W., Secomb T.W.* Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue // *Nat. Rev. Cancer.* – 2017. – V. 17, No 12. – P. 738–750. – doi: 10.1038/nrc.2017.93.
25. *Dewhirst M.W., Ashcraft K.A.* Implications of increase in vascular permeability in tumors by VEGF: A commentary on the pioneering work of Harold Dvorak // *Cancer Res.* – 2016. – V. 76, No 11. – P. 3118–3120. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1292.
26. *LaGory E.L., Giaccia A.J.* The ever-expanding role of HIF in tumour and stromal biology // *Nat. Cell Biol.* – 2016. – V. 18, No 4. – P. 356–365. – doi: 10.1038/ncb3330.
27. *De Palma M., Biziato D., Petrova T.V.* Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis // *Nat. Rev. Cancer.* – 2017. – V. 17, No 8. – P. 457–474. – doi: 10.1038/nrc.2017.51.
28. *Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., James V., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V.* Therapeutic prospects of extracellular vesicles in cancer treatment // *Front. Immunol.* – 2018. – V. 9. – Art. 1534, P. 1–10. – doi: 10.3389/fimmu.2018.01534.
29. *Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., Tazetdinova L.G., James V., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V.* Application of mesenchymal stem cells for therapeutic agent delivery in anti-tumor treatment // *Front. Pharmacol.* – 2018. – V.9. – Art. 259, P. 1–10. – doi: 10.3389/fphar.2018.00259.

30. *Chulpanova D.S., Solovyeva V.V., Kitaeva K.V., Dunham S.P., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A.* Recombinant viruses for cancer therapy // *Biomedicines*. – 2018. – V. 6, No 4. – Art. 94, P. 1–14. – doi: 10.3390/biomedicines6040094.
31. *Waud W.R.* Murine L1210 and P388 leukemias // *Teicher B. (Ed.) Tumor models in cancer research*. – Totowa, N. J.: Humana Press, 2011. – P. 23–41. – doi: 10.1007/978-1-60761-968-0_2.
32. *Мингалева Р.Н., Соловьева В.В., Бламм Н.Л., Ризванов А.А.* Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов in vitro // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 20–28.
33. *Takimoto C.H.* Anticancer drug development at the US National Cancer Institute // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2003. – V. 52, Suppl. 1. – P. S29–S33. – doi: 10.1007/s00280-003-0623-y.
34. *Blatt N.L., Mingaleeva R.N., Khaiboullina S.F., Lombardi V.C., Rizvanov A.A.* Application of cell and tissue culture systems for anticancer drug screening // *World Appl. Sci. J.* – 2013. – V. 23. – P. 315–325. – doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.23.03.13064.
35. *Holbeck S.L., Camalier R., Crowell J.A., Govindharajulu J.P., Hollingshead M., Anderson L.W., Polley E., Rubinstein L., Srivastava A., Wilsker D., Collins J.M., Doroshow J.H.* The National Cancer Institute ALMANAC: A comprehensive screening resource for the detection of anticancer drug pairs with enhanced therapeutic activity // *Cancer Res.* – 2017. – V. 77, No 13. – P. 3564–3576. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0489.
36. *Adams J.* Development of the proteasome inhibitor PS-341 // *Oncologist*. – 2002. – V. 7, No 1. – P. 9–16. – doi: 10.1634/theoncologist.7-1-9.
37. *Madadi N.R., Penthala N.R., Ketkar A., Eoff R.L., Trujillo-Alonso V., Guzman M.L., Crooks P.A.* Synthesis and evaluation of 2-naphthaleno trans-stilbenes and cyanostilbenes as anticancer agents // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2018. – V. 18, No 4. – P. 556–564. – doi: 10.2174/1871521409666170412115703.
38. *Nakatsu N., Nakamura T., Yamazaki K., Sadahiro S., Makuuchi H., Kanno J., Yamori T.* Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines // *Mol. Pharmacol.* – 2007. – V. 72, No 5. – P. 1171–1180. – doi: 10.1124/mol.107.038836.
39. *Kong D., Yamori T.* JFCR39, a panel of 39 human cancer cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs // *Bioorg. Med. Chem.* – 2012. – V. 20, No 6. – P. 1947–1951. – doi: 10.1016/j.bmc.2012.01.017.
40. *Shoemaker R.H.* The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen // *Nat. Rev. Cancer*. – 2006. – V. 6, No 10. – P. 813–823. – doi: 10.1038/nrc1951.
41. *Desrochers T.M., Palma E., Kaplan D.L.* Tissue-engineered kidney disease models // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2014. – V. 69–70. – P. 67–80. – doi: 10.1016/j.addr.2013.12.002.
42. *Chen L., Xiao Z., Meng Y., Zhao Y., Han J., Su G., Chen B., Dai J.* The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs // *Biomaterials*. – 2012. – V. 33, No 5. – P. 1437–1444. – doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.056.
43. *Riedl A., Schleder M., Pudelko K., Stadler M., Walter S., Unterleuthner D., Unger C., Kramer N., Hengstschlager M., Kenner L., Pfeiffer D., Krupitza G., Dolznig H.* Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses // *J. Cell Sci.* – 2017. – V. 130, No 1. – P. 203–218. – doi: 10.1242/jcs.188102.
44. *Uchida Y., Tanaka S., Aihara A., Adikrisna R., Yoshitake K., Matsumura S., Mitsunori Y., Murakata A., Noguchi N., Irie T., Kudo A., Nakamura N., Lai P.B., Arii S.* Analogy between sphere forming ability and stemness of human hepatoma cells // *Oncology Rep.* – 2010. – V. 24, No 5. – P. 1147–1151. – doi: 10.3892/or_00000966.

45. *Melissaridou S., Wiechec E., Magan M., Jain M.V., Chung M.K., Farnebo L., Roberg K.* The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer // *Cancer Cell Int.* – 2019. – V. 19. – Art. 16, P. 1–10. – doi: 10.1186/s12935-019-0733-1.
46. *Kitaeva K.V., Prudnikov T.S., Gomzikova M.O., Kletukhina S.K., James V., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V.* Analysis of the interaction and proliferative activity of adenocarcinoma, peripheral blood mononuclear and mesenchymal stromal cells after co-cultivation in vitro // *BioNanoScience.* – 2019. – V. 9, No 2. – P. 502–509. – doi: 10.1007/s12668-019-00625-z.
47. *Ravi M., Ramesh A., Pattabhi A.* Contributions of 3D cell cultures for cancer research // *J. Cell. Physiol.* – 2017. – V. 232, No 10. – P. 2679–2697. – doi: 10.1002/jcp.25664.
48. *Luca A.C., Mersch S., Deenen R., Schmidt S., Messner I., Schafer K.L., Baldus S.E., Huckenbeck W., Piekorz R.P., Knoefel W.T., Krieg A., Stoecklein N.H.* Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8, No 3. – Art. e59689. P. 1–11. – doi: 10.1371/journal.pone.0059689.
49. *Zoetemelk M., Rausch M., Colin D.J., Dormond O., Nowak-Sliwinska P.* Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9, No 1. – Art. 7103, P. 1–14. – doi: 10.1038/s41598-019-42836-0.
50. *Osswald A., Hedrich V., Sommergruber W.* 3D-3 tumor models in drug discovery for analysis of immune cell infiltration // *Methods Mol. Biol.* – 2019. – V. 1953. – P. 151–162. – doi: 10.1007/978-1-4939-9145-7_10.
51. *Puls T.J., Tan X., Husain M., Whittington C.F., Fishel M.L., Voytik-Harbin S.L.* Development of a novel 3D tumor-tissue invasion model for high-throughput, high-content phenotypic drug screening // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8, No 1. – Art. 13039, P. 1–14. – doi: 10.1038/s41598-018-31138-6.
52. *Clevers H.* Modeling development and disease with organoids // *Cell.* – 2016. – V. 165, No 7. – P. 1586–1597. – doi: 10.1016/j.cell.2016.05.082.
53. *Hu J.L., Todhunter M.E., LaBarge M.A., Gartner Z.J.* Opportunities for organoids as new models of aging // *J. Cell. Biol.* – 2018. – V. 217, No 1. – P. 39–50. – doi: 10.1083/jcb.201709054.
54. *Kim M., Mun H., Sung C.O., Cho E.J., Jeon H.J., Chun S.M., Jung D.J., Shin T.H., Jeong G.S., Kim D.K., Choi E.K., Jeong S.Y., Taylor A.M., Jain S., Meyerson M., Jang S.J.* Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10, No 1. – Art. 3991, P. 1–15. – doi: 10.1038/s41467-019-11867-6.
55. *Nelson S.R., Zhang C., Roche S., O'Neill F., Swan N., Luo Y., Larkin A., Crown J., Walsh N.* Modelling of pancreatic cancer biology: transcriptomic signature for 3D PDX-derived organoids and primary cell line organoid development // *Sci. Rep.* – 2020. – V. 10, No 1. – Art. 2778. P. 1–12. – doi: 10.1038/s41598-020-59368-7.
56. *Lee S., Burner D.N., Mendoza T.R., Muldong M.T., Arreola C., Wu C.N., Cacalano N.A., Kulidjian A.A., Kane C.J., Jamieson C.A.M.* Establishment and analysis of three-dimensional (3D) organoids derived from patient prostate cancer bone metastasis specimens and their xenografts // *J. Visualized Exp.* – 2020. – V. 156. – Art. e60367. – doi: 10.3791/60367.
57. *Mullenders J., de Jongh E., Brousalı A., Roosen M., Blom J.P.A., Begthel H., Korving J., Jonges T., Kranenburg O., Meijer R., Clevers H.C.* Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2019. – V. 116, No 10. – P. 4567–4574. – doi: 10.1073/pnas.1803595116.

58. Lv D., Hu Z., Lu L., Lu H., Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery // *Oncol. Lett.* – 2017. – V. 14, No 6. – P. 6999–7010. – doi: 10.3892/ol.2017.7134.
59. Falasca M., Raimondi C., Maffucci T. Boyden chamber // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – V. 769. – P. 87–95. – doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_7.
60. Clemente N., Argenziano M., Gigliotti C.L., Ferrara B., Boggio E., Chiocchetti A., Caldera F., Trotta F., Benetti E., Annaratone L., Ribero S., Pizzimenti S., Barrera G., Dianzani U., Cavalli R., Dianzani C. Paclitaxel-loaded nanosponges inhibit growth and angiogenesis in melanoma cell models // *Front. Pharmacol.* – 2019. – V. 10. – Art. 776, P. 1–13. – doi: 10.3389/fphar.2019.00776.
61. Wessely A., Waltera A., Reichert T.E., Stöckl S., Grässel S., Bauer R.J. Induction of ALP and MMP9 activity facilitates invasive behavior in heterogeneous human BMSC and HNSCC 3D spheroids // *FASEB J.* – 2019. – V. 33, No 11. – P. 11884–11893. – doi: 10.1096/fj.201900925R.
62. Tovari J., Futosi K., Bartal A., Tatrai E., Gacs A., Kenessey I., Paku S. Boyden chamber-based method for characterizing the distribution of adhesions and cytoskeletal structure in HT1080 fibrosarcoma cells // *Cell Adhes. Migr.* – 2014. – V. 8, No 5. – P. 509–516. – doi: 10.4161/cam.28734.
63. Ruzicka M., Cimpan M.R., Rios-Mondragon I., Grudzinski I.P. Microfluidics for studying metastatic patterns of lung cancer // *J. Nanobiotechnol.* – 2019. – V. 17, No 1. – Art. 71, P. 1–30. – doi: 10.1186/s12951-019-0492-0.
64. Anguiano M., Castilla C., Maska M., Ederra C., Pelaez R., Morales X., Munoz-Arrieta G., Mujika M., Kozubek M., Munoz-Barrutia A., Rouzaut A., Arana S., Garcia-Aznar J.M., Ortiz-de-Solorzano C. Characterization of three-dimensional cancer cell migration in mixed collagen-Matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis // *PLoS ONE.* – 2017. – V. 12, No 2. – Art. e0171417, P. 1–24. – doi: 10.1371/journal.pone.0171417.
65. Wang S., Li E., Gao Y., Wang Y., Guo Z., He J., Zhang J., Gao Z., Wang Q. Study on invadopodia formation for lung carcinoma invasion with a microfluidic 3D culture device // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8, No 2. – Art. e56448, P. 1–7. – doi: 10.1371/journal.pone.0056448.
66. Mi S., Du Z., Xu Y., Wu Z., Qian X., Zhang M., Sun W. Microfluidic co-culture system for cancer migratory analysis and anti-metastatic drugs screening // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – Art. 35544, P. 1–11. – doi: 10.1038/srep35544.
67. Kuhlbach C., da Luz S., Baganz F., Hass V.C., Mueller M.M. A microfluidic system for the investigation of tumor cell extravasation // *Bioengineering (Basel).* – 2018. – V. 5, No 2. – Art. 40, P. 1–20. – doi: 10.3390/bioengineering5020040.
68. Lee V.K., Yoo S., Zou H., Friedel R., Dai G. 3D bio-printed model of glioblastoma-vascular niche // *Tissue Eng., Pt. A.* – 2016. – V. 22, No S1. – P. S-60–S-61. – doi: 10.1089/ten.tea.2016.5000.abstracts.
69. Truong D., Fiorelli R., Barrientos E.S., Melendez E.L., Sanai N., Mehta S., Nikkhah M. A three-dimensional (3D) organotypic microfluidic model for glioma stem cells – vascular interactions // *Biomaterials.* – 2019. – V. 198. – P. 63–77. – doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.048.
70. Kingsley D.M., Roberge C.L., Rudkouskaya A., Faulkner D.E., Barroso M., Intes X., Corr D.T. Laser-based 3D bioprinting for spatial and size control of tumor spheroids and embryoid bodies // *Acta Biomater.* – 2019. – V. 95. – P. 357–370. – doi: 10.1016/j.actbio.2019.02.014.
71. Li Y., Zhang T., Pang Y., Li L., Chen Z.N., Sun W. 3D bioprinting of hepatoma cells and application with microfluidics for pharmacodynamic test of Metuzumab // *Biofabrication.* – 2019. – V. 11, No 3. – Art. 034102, P. 1–13. – doi: 10.1088/1758-5090/ab256c.

72. Jiang T., Munguia-Lopez J., Flores-Torres S., Grant J., Vijayakumar S., De Leon-Rodriguez A., Kinsella J.M. Bioprintable alginate/gelatin hydrogel 3D in vitro model systems induce cell spheroid formation // *J. Visualized Exp.* – 2018. – V. 137. – Art. 57826, P. 1–11. – doi: 10.3791/57826.
73. Wang Y., Shi W., Kuss M., Mirza S., Qi D.J., Krasnoslobodtsev A., Zeng J.P., Band H., Band V., Duan B. 3D bioprinting of breast cancer models for drug resistance study // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2018. – V. 4, No 12. – P. 4401–4411. – doi: 10.1021/acsbomaterials.8b01277.
74. Heinrich M.A., Bansal R., Lammers T., Zhang Y.S., Michel Schiffelers R., Prakash J. 3D-bioprinted mini-brain: A glioblastoma model to study cellular interactions and therapeutics // *Adv. Mater.* – 2019. – V. 31, No 14. – Art. 1806590, P. 1–9. – doi: 10.1002/adma.201806590.
75. Langer E.M., Allen-Petersen B.L., King S.M., Kendsersky N.D., Turnidge M.A., Kuziel G.M., Riggers R., Samatham R., Amery T.S., Jacques S.L., Sheppard B.C., Korkola J.E., Muschler J.L., Thibault G., Chang Y.H., Gray J.W., Presnell S.C., Nguyen D.G., Sears R.C. Modeling tumor phenotypes in vitro with three-dimensional bioprinting // *Cell Rep.* – 2019. – V. 26, No 3. – P. 608–623.e1–e6. – doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.090.
76. Dai X., Ma C., Lan Q., Xu T. 3D bioprinted glioma stem cells for brain tumor model and applications of drug susceptibility // *Biofabrication.* – 2016. – V. 8, No 4. – Art. 045005, P. 1–11. – doi: 10.1088/1758-5090/8/4/045005.
77. Meng F., Meyer C.M., Joung D., Vallera D.A., McAlpine M.C., Panoskaltzis-Mortari A. 3D bioprinted in vitro metastatic models via reconstruction of tumor microenvironments // *Adv. Mater.* – 2019. – V. 31, No 10. – Art. 1806899, P. 1–10. – doi: 10.1002/adma.201806899.
78. Knowlton S., Onal S., Yu C.H., Zhao J.J., Tasoglu S. Bioprinting for cancer research // *Trends Biotechnol.* – 2015. – V. 33, No 9. – P. 504–513. – doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.007.

Поступила в редакцию
06.05.2020

Китаева Кристина Викторовна, аспирант кафедры генетики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: olleth@mail.ru

Ризванов Альберт Анатольевич, доктор биологических наук, профессор кафедры генетики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: Albert.Rizvanov@kpfu.ru

Соловьева Валерия Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ OpenLab Генные и клеточные технологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: solovyovavv@gmail.com

REVIEW ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2021.2.155-176

**Modern Methods of Preclinical Anticancer Drug Screening
Using Test Systems Based on Cell Cultures**

K.V. Kitaeva*, A.A. Rizvanov**, V.V. Solovyeva***

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: *ollet@mail.ru, **Albert.Rizvanov@kpfu.ru, ***solovyovavv@gmail.com

Received May 6, 2020

Abstract

Preclinical screening of medicinal drugs for novel anti-cancer treatments faces a problem of a rational approach to primary screening of substances with antitumor activity. Low correlation between *in vitro* and *in vivo* studies with clinical trials remains a serious issue. Choosing the right tumor model at the *in vitro* testing stage reduces the financial and time costs of finding and testing promising antitumor agents. In the light of the growing prevalence of cancer, it is urgently important to develop new approaches to screening of anticancer drugs, as well as to increase the pace of creation, development, and testing of new antitumor agents. Although the pharmaceutical industry uses mainly two-dimensional *in vitro* models, the field of preclinical screening needs more complex models, such as three-dimensional models, microfluidic systems, Boyden chamber, and models created using three-dimensional bioprinting. This review describes the above *in vitro* tumor models, including their use in research and features, in order to help researchers and clinicians from various fields of pharmacy, preclinical studies, and cell biology understand their prospects for screening potential antitumor drugs.

Keywords: antitumor drug screening, *in vitro* tumor model, two-dimensional cultures, three-dimensional cultures, microfluidic systems, Boyden chamber, tumor microenvironment, 3D bioprinting

Acknowledgments. The work is performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University and supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 17-00-00263).

Figure Captions

Fig. 1. Test systems for anticancer drug screening: *a*) 2D cultures: 1 – monolayer of tumor cells, 2 – co-culture of tumor and stromal cells; *b*) 3D models of multicellular spheroids: 1 – spheroids consisting of tumor cells, 2 – tumor stroma model based on co-cultivation of several types of cells using the extracellular matrix model, 3 – spheroids created by the method of hanging drops; *c*) Boyden chamber for analysis of cell migration: cells with high invasive potential pass through a porous semipermeable membrane; *d*) microfluidic system for assessing the invasive potential of tumor cells: a mixture of hydrogel and cells is placed in the central channel, medium containing/devoid of factors (depending on the purpose of the experiment) placed in the lateral channels; *e*) tumor models created using bioprinting: 1 – layer of tumor cells between the layers of stromal cells, 2 – spheroids consisting of tumor cells, 3 – spheroids simulating tumor stroma and consisting of tumor cells mixed with stromal cells, 4 – glioma model embedded in the 3D-printed brain containing glioma cells and macrophages.

References

1. Hay M., Thomas D.W., Craighead J.L., Economides C., Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat. Biotechnol.*, 2014, vol. 32, no. 1, pp. 40–51. doi: 10.1038/nbt.2786.

2. Hobbs B.P., Barata P.C., Kanjanapan Y., Paller C.J., Perlmutter J., Pond G.R., Prowell T.M., Rubin E.H., Seymour L.K., Wages N.A., Yap T.A., Feltquate D., Garrett-Mayer E., Grossman W., Hong D.S., Ivy S.P., Siu L.L., Reeves S.A., Rosner G.L. Seamless designs: Current practice and considerations for early-phase drug development in oncology. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2019, vol. 111, no. 2, pp. 118–128. doi: 10.1093/jnci/djy196.
3. Imamura Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., Kiyota N., Takao S., Kono S., Nakatsura T., Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol. Rep.*, 2015, vol. 33, no. 4, pp. 1837–1843. doi: 10.3892/or.2015.3767.
4. Stevens J.L., Baker T.K. The future of drug safety testing: Expanding the view and narrowing the focus. *Drug Discovery Today*, 2009, vol. 14, nos. 3–4, pp. 162–167. doi: 10.1016/j.drudis.2008.11.009.
5. Bileckot R., Masson C., Ntsiba H., Mbongo J.A., Biendo M., Yala F., Bregeon C. Prospective study of rheumatic manifestations in human immunodeficiency virus infection. Apropos of 26 cases in Congo. *Rev. Rhum. Mal. Osteo-Articulaires*, 1991, vol. 58, no. 3, pp. 163–168.
6. Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., Rutland C.S., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Mouse tumor models for advanced cancer immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, vol. 21, no. 11, art. 4118, pp. 1–15. doi: 10.3390/ijms21114118.
7. Kitaeva K.V., Rutland C.S., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Cell culture based *in vitro* test systems for anticancer drug screening. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, vol. 8, art. 322, pp. 1–9. doi: 10.3389/fbioe.2020.00322.
8. Chiantore M.V., Mangino G., Zangrillo M.S., Iuliano M., Affabris E., Fiorucci G., Romeo G. Role of the microenvironment in tumorigenesis: Focus on virus-induced tumors. *Curr. Med. Chem.*, 2015, vol. 22, no. 8, pp. 958–974. doi: 10.2174/0929867322666141212121751.
9. Gal P., Varinska L., Faber L., Novak S., Szabo P., Mitrengova P., Mirossay A., Mucaji P., Smetana K. How signaling molecules regulate tumor microenvironment: Parallels to wound repair. *Molecules*, 2017, vol. 22, no. 11, art. 1818, pp. 1–17. doi: 10.3390/molecules22111818.
10. Zhou X., Li Z., Zhou J. Tumor necrosis factor α in the onset and progression of leukemia. *Exp. Hematol.*, 2017, vol. 45, pp. 17–26. doi: 10.1016/j.exphem.2016.10.005.
11. Kursunel M.A., Esendagli G. The untold story of IFN- γ in cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2016, vol. 31, pp. 73–81. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.07.005.
12. Song Z., Ren D., Xu X., Wang Y. Molecular cross-talk of IL-6 in tumors and new progress in combined therapy. *Thorac. Cancer*, 2018, vol. 9, no. 6, pp. 669–675. doi: 10.1111/1759-7714.12633.
13. Alfaro C., Sanmamed M.F., Rodriguez-Ruiz M.E., Teijeira A., Onate C., Gonzalez A., Ponz M., Schalper K.A., Perez-Gracia J.L., Melero I. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treat. Rev.*, 2017, vol. 60, pp. 24–31. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.08.004.
14. Malik A., Kanneganti T.-D. Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. *Immunol. Rev.*, 2018, vol. 281, no. 1, pp. 124–137. doi: 10.1111/imr.12615.
15. Papageorgis P., Stylianopoulos T. Role of TGF β in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review). *Int. J. Oncol.*, 2015, vol. 46, no. 3, pp. 933–943. doi: 10.3892/ijo.2015.2816.
16. Nagarsheth N., Wicha M.S., Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, vol. 17, no. 9, pp. 559–572. doi: 10.1038/nri.2017.49.
17. Wu T., Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett.*, 2017, vol. 387, pp. 61–68. doi: 10.1016/j.canlet.2016.01.043.
18. Kusmartsev S., Gabrilovich D.I. Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 2006, vol. 25, no. 3, pp. 323–331. doi: 10.1007/s10555-006-9002-6.
19. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2012, vol. 21, no. 3, pp. 309–322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.
20. Sun Z., Wang S., Zhao R.C. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J. Hematol. Oncol.*, 2014, vol. 7, art. 14, pp. 1–10. doi: 10.1186/1756-8722-7-14.
21. Payne K.K., Bear H.D., Manjili M.H. Adoptive cellular therapy of cancer: Exploring innate and adaptive cellular crosstalk to improve anti-tumor efficacy. *Future Oncol.*, 2014, vol. 10, no. 10, pp. 1779–1794. doi: 10.2217/fon.14.97.

22. Insua-Rodriguez J., Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2016, vol. 97, pp. 41–55. doi: 10.1016/j.addr.2015.12.017.
23. Trivanovic D., Krstic J., Djordjevic I.O., Mojsilovic S., Santibanez J.F., Bugarski D., Jaukovic A. The roles of mesenchymal stromal/stem cells in tumor microenvironment associated with inflammation. *Mediators Inflammation*, 2016, vol. 2016, art. 7314016, pp. 1–14. doi: 10.1155/2016/7314016.
24. Dewhirst M.W., Secomb T.W. Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. *Nat. Rev. Cancer*, 2017, vol. 17, no. 12, pp. 738–750. doi: 10.1038/nrc.2017.93.
25. Dewhirst M.W., Ashcraft K.A. Implications of increase in vascular permeability in tumors by VEGF: A commentary on the pioneering work of Harold Dvorak. *Cancer Res.*, 2016, vol. 76, no. 11, pp. 3118–3120. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1292.
26. LaGory E.L., Giaccia A.J. The ever-expanding role of HIF in tumour and stromal biology. *Nat. Cell Biol.*, 2016, vol. 18, no. 4, pp. 356–365. doi: 10.1038/ncb3330.
27. De Palma M., Bizziato D., Petrova T.V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2017, vol. 17, no. 8, pp. 457–474. doi: 10.1038/nrc.2017.51.
28. Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., James V., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Therapeutic prospects of extracellular vesicles in cancer treatment. *Front. Immunol.*, 2018, vol. 9, art. 1534, pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2018.01534.
29. Chulpanova D.S., Kitaeva K.V., Tazetdinova L.G., James V., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Application of mesenchymal stem cells for therapeutic agent delivery in anti-tumor treatment. *Front. Pharmacol.*, 2018, vol. 9, art. 259, pp. 1–10. doi: 10.3389/fphar.2018.00259.
30. Chulpanova D.S., Solovyeva V.V., Kitaeva K.V., Dunham S.P., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A. Recombinant viruses for cancer therapy. *Biomedicines*, 2018, vol. 6, no. 4, art. 94, pp. 1–14. doi: 10.3390/biomedicines6040094.
31. Waud W.R. Murine L1210 and P388 leukemias. In: Teicher B. (Ed.) *Tumor Models in Cancer Research*. Totowa, N. J., Humana Press, 2011, pp. 23–41. doi: 10.1007/978-1-60761-968-0_2.
32. Mingaleeva R.N., Solovyeva V.V., Blatt N.L., Rizvanov A.A. Application of cell and tissue cultures for potential anti-cancer/oncology drugs screening in vitro. *Kletochnaya Transplantol. Tkaneyaya Inzh.*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. 20–28. (In Russian)
33. Takimoto C.H. Anticancer drug development at the US National Cancer Institute. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2003, vol. 52, suppl. 1, pp. S29–S33. doi: 10.1007/s00280-003-0623-y.
34. Blatt N.L., Mingaleeva R.N., Khaiboullina S.F., Lombardi V.C., Rizvanov A.A. Application of cell and tissue culture systems for anticancer drug screening. *World Appl. Sci. J.*, 2013, vol. 23, pp. 315–325. doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.23.03.13064.
35. Holbeck S.L., Camalier R., Crowell J.A., Govindharajulu J.P., Hollingshead M., Anderson L.W., Polley E., Rubinstein L., Srivastava A., Wilsker D., Collins J.M., Doroshow J.H. The National Cancer Institute ALMANAC: A comprehensive screening resource for the detection of anticancer drug pairs with enhanced therapeutic activity. *Cancer Res.*, 2017, vol. 77, no. 13, pp. 3564–3576. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0489.
36. Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist*, 2002, vol. 7, no. 1, pp. 9–16. doi: 10.1634/theoncologist.7-1-9.
37. Madadi N.R., Penthalala N.R., Ketkar A., Eoff R.L., Trujillo-Alonso V., Guzman M.L., Crooks P.A. Synthesis and evaluation of 2-naphthaleno trans-stilbenes and cyanostilbenes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2018, vol. 18, no. 4, pp. 556–564. doi: 10.2174/1871521409666170412115703.
38. Nakatsu N., Nakamura T., Yamazaki K., Sadahiro S., Makuuchi H., Kanno J., Yamori T. Evaluation of action mechanisms of toxic chemicals using JFCR39, a panel of human cancer cell lines. *Mol. Pharmacol.*, 2007, vol. 72, no. 5, pp. 1171–1180. doi: 10.1124/mol.107.038836.
39. Kong D., Yamori T. JFCR39, a panel of 39 human cancer cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, vol. 20, no. 6, pp. 1947–1951. doi: 10.1016/j.bmc.2012.01.017.
40. Shoemaker R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, vol. 6, no. 10, pp. 813–823. doi: 10.1038/nrc1951.
41. Desrochers T.M., Palma E., Kaplan D.L. Tissue-engineered kidney disease models. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2014, vols. 69–70, pp. 67–80. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.002.

42. Chen L., Xiao Z., Meng Y., Zhao Y., Han J., Su G., Chen B., Dai J. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Bio-materials*, 2012, vol. 33, no. 5, pp. 1437–1444. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.056.
43. Riedl A., Schleder M., Pudelho K., Stadler M., Walter S., Unterleuthner D., Unger C., Kramer N., Hengstschlager M., Kenner L., Pfeiffer D., Krupitza G., Dolznig H. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses. *J. Cell Sci.*, 2017, vol. 130, no. 1, pp. 203–218. doi: 10.1242/jcs.188102.
44. Uchida Y., Tanaka S., Aihara A., Adikrisna R., Yoshitake K., Matsumura S., Mitsunori Y., Murakata A., Noguchi N., Irie T., Kudo A., Nakamura N., Lai P.B., Aii S. Analogy between sphere forming ability and stemness of human hepatoma cells. *Oncol. Rep.*, 2010, vol. 24, no. 5, pp. 1147–1151. doi: 10.3892/or_00000966.
45. Melissaridou S., Wiechec E., Magan M., Jain M.V., Chung M.K., Farnebo L., Roberg K. The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int.*, 2019, vol. 19, art. 16, pp. 1–10. doi: 10.1186/s12935-019-0733-1.
46. Kitaeva K.V., Prudnikov T.S., Gomzikova M.O., Kletukhina S.K., James V., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Analysis of the interaction and proliferative activity of adenocarcinoma, peripheral blood mononuclear and mesenchymal stromal cells after co-cultivation in vitro. *BioNanoScience*, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 502–509. doi: 10.1007/s12668-019-00625-z.
47. Ravi M., Ramesh A., Pattabhi A. Contributions of 3D cell cultures for cancer research. *J. Cell. Physiol.*, 2017, vol. 232, no. 10, pp. 2679–2697. doi: 10.1002/jcp.25664.
48. Luca A.C., Mersch S., Deenen R., Schmidt S., Messner I., Schafer K.L., Baldus S.E., Huckenbeck W., Piekorz R.P., Knoefel W.T., Krieg A., Stoecklein N.H. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 3, art. e59689, pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0059689.
49. Zoetemelk M., Rausch M., Colin D.J., Dormond O., Nowak-Sliwinska P. Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, no. 1, art. 7103, pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-019-42836-0.
50. Osswald A., Hedrich V., Sommergruber W. 3D-3 tumor models in drug discovery for analysis of immune cell infiltration. *Methods Mol. Biol.*, 2019, vol. 1953, pp. 151–162. doi: 10.1007/978-1-4939-9145-7_10.
51. Puls T.J., Tan X., Husain M., Whittington C.F., Fishel M.L., Voytik-Harbin S.L. Development of a novel 3D tumor-tissue invasion model for high-throughput, high-content phenotypic drug screening. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1, art. 13039, pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-31138-6.
52. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 2016, vol. 165, no. 7, pp. 1586–1597. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.082.
53. Hu J.L., Todhunter M.E., LaBarge M.A., Gartner Z.J. Opportunities for organoids as new models of aging. *J. Cell. Biol.*, 2018, vol. 217, no. 1, pp. 39–50. doi: 10.1083/jcb.201709054.
54. Kim M., Mun H., Sung C.O., Cho E.J., Jeon H.J., Chun S.M., Jung D.J., Shin T.H., Jeong G.S., Kim D.K., Choi E.K., Jeong S.Y., Taylor A.M., Jain S., Meyerson M., Jang S.J. Patient-derived lung cancer organoids as *in vitro* cancer models for therapeutic screening. *Nat. Commun.*, 2019, vol. 10, no. 1, art. 3991, pp. 1–15. doi: 10.1038/s41467-019-11867-6.
55. Nelson S.R., Zhang C., Roche S., O'Neill F., Swan N., Luo Y., Larkin A., Crown J., Walsh N. Modelling of pancreatic cancer biology: transcriptomic signature for 3D PDX-derived organoids and primary cell line organoid development. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no. 1, art. 2778, pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-59368-7.
56. Lee S., Burner D.N., Mendoza T.R., Muldong M.T., Arreola C., Wu C.N., Cacalano N.A., Kulidjian A.A., Kane C.J., Jamieson C.A.M. Establishment and analysis of three-dimensional (3D) organoids derived from patient prostate cancer bone metastasis specimens and their xenografts. *J. Visualized Exp.*, 2020, vol. 156, art. e60367. doi: 10.3791/60367.
57. Mullenders J., de Jongh E., Brousalı A., Roosen M., Blom J.P.A., Begthel H., Korving J., Jonges T., Kranenburg O., Meijer R., Clevers H.C. Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, vol. 116, no. 10, pp. 4567–4574. doi: 10.1073/pnas.1803595116.

58. Lv D., Hu Z., Lu L., Lu H., Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol. Lett.*, 2017, vol. 14, no. 6, pp. 6999–7010. doi: 10.3892/ol.2017.7134.
59. Falasca M., Raimondi C., Maffucci T. Boyden chamber. *Methods Mol. Biol.*, 2011, vol. 769, pp. 87–95. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_7.
60. Clemente N., Argenziano M., Gigliotti C.L., Ferrara B., Boggio E., Chiocchetti A., Caldera F., Trotta F., Benetti E., Annaratone L., Ribero S., Pizzimenti S., Barrera G., Dianzani U., Cavalli R., Dianzani C. Paclitaxel-loaded nanospheres inhibit growth and angiogenesis in melanoma cell models. *Front. Pharmacol.*, 2019, vol. 10, art. 776, pp. 1–13. doi: 10.3389/fphar.2019.00776.
61. Wessely A., Waltera A., Reichert T.E., Stöckl S., Grässel S., Bauer R.J. Induction of ALP and MMP9 activity facilitates invasive behavior in heterogeneous human BMSC and HNSCC 3D spheroids. *FASEB J.*, 2019, vol. 33, no. 11, pp. 11884–11893. doi: 10.1096/fj.201900925R.
62. Tovari J., Futosi K., Bartal A., Tatrai E., Gacs A., Kenessey I., Paku S. Boyden chamber-based method for characterizing the distribution of adhesions and cytoskeletal structure in HT1080 fibrosarcoma cells. *Cell Adhes. Migr.*, 2014, vol. 8, no. 5, pp. 509–516. doi: 10.4161/cam.28734.
63. Ruzicka M., Cimpan M.R., Rios-Mondragon I., Grudzinski I.P. Microfluidics for studying metastatic patterns of lung cancer. *J. Nanobiotechnol.*, 2019, vol. 17, no. 1, art. 71, pp. 1–30. doi: 10.1186/s12951-019-0492-0.
64. Anguiano M., Castilla C., Maska M., Ederra C., Pelaez R., Morales X., Munoz-Arrieta G., Mujika M., Kozubek M., Munoz-Barrutia A., Rouzaut A., Arana S., Garcia-Aznar J.M., Ortiz-de-Solorzano C. Characterization of three-dimensional cancer cell migration in mixed collagen-Matrigel scaffolds using microfluidics and image analysis. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 2, art. e0171417, pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0171417.
65. Wang S., Li E., Gao Y., Wang Y., Guo Z., He J., Zhang J., Gao Z., Wang Q. Study on invadopodia formation for lung carcinoma invasion with a microfluidic 3D culture device. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 2, art. e56448, pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0056448.
66. Mi S., Du Z., Xu Y., Wu Z., Qian X., Zhang M., Sun W. Microfluidic co-culture system for cancer migratory analysis and anti-metastatic drugs screening. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6, art. 35544, pp. 1–11. doi: 10.1038/srep35544.
67. Kuhlbach C., da Luz S., Baganz F., Hass V.C., Mueller M.M. A microfluidic system for the investigation of tumor cell extravasation. *Bioengineering* (Basel), 2018, vol. 5, no. 2, art. 40, pp. 1–20. doi: 10.3390/bioengineering5020040.
68. Lee V.K., Yoo S., Zou H., Friedel R., Dai G. 3D bio-printed model of glioblastoma-vascular niche. *Tissue Eng., Pt. A*, 2016, vol. 22, no. S1, pp. S-60–S-61. doi: 10.1089/ten.tea.2016.5000.abstracts.
69. Truong D., Fiorelli R., Barrientos E.S., Melendez E.L., Sanai N., Mehta S., Nikkha M. A three-dimensional (3D) organotypic microfluidic model for glioma stem cells – vascular interactions. *Biomaterials*, 2018, vol. 198, pp. 63–67. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.048.
70. Kingsley D.M., Roberge C.L., Rudkouskaya A., Faulkner D.E., Barroso M., Intes X., Corr D.T. Laser-based 3D bioprinting for spatial and size control of tumor spheroids and embryoid bodies. *Acta Biomater.*, 2019, vol. 95, pp. 357–370. doi: 10.1016/j.actbio.2019.02.014.
71. Li Y., Zhang T., Pang Y., Li L., Chen Z.N., Sun W. 3D bioprinting of hepatoma cells and application with microfluidics for pharmacodynamic test of Metuzumab. *Biofabrication*, 2019, vol. 11, no. 3, art. 034102, pp. 1–13. doi: 10.1088/1758-5090/ab256c.
72. Jiang T., Munguia-Lopez J., Flores-Torres S., Grant J., Vijayakumar S., De Leon-Rodriguez A., Kinsella J.M. Bioprintable alginate/gelatin hydrogel 3D in vitro model systems induce cell spheroid formation. *J. Visualized Exp.*, 2018, vol. 137, art. e57826, pp. 1–11. doi: 10.3791/57826.
73. Wang Y., Shi W., Kuss M., Mirza S., Qi D.J., Krasnoslobodtsev A., Zeng J.P., Band H., Band V., Duan B. 3D bioprinting of breast cancer models for drug resistance study. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2018, vol. 4, no. 12, pp. 4401–4411. doi: 10.1021/acsbomaterials.8b01277.
74. Heinrich M.A., Bansal R., Lammers T., Zhang Y.S., Michel Schiffelers R., Prakash J. 3D-bioprinted mini-brain: A glioblastoma model to study cellular interactions and therapeutics. *Adv. Mater.*, 2019, vol. 31, no. 14, art. e1806590, pp. 1–9. doi: 10.1002/adma.201806590.
75. Langer E.M., Allen-Petersen B.L., King S.M., Kendsersky N.D., Turnidge M.A., Kuziel G.M., Riggers R., Samatham R., Amery T.S., Jacques S.L., Sheppard B.C., Korkola J.E., Muschler J.L., Thibault G., Chang Y.H., Gray J.W., Presnell S.C., Nguyen D.G., Sears R.C. Modeling tumor pheno-

- types in vitro with three-dimensional bioprinting. *Cell Rep.*, 2019, vol. 26, no. 3, pp. 608–623.e1–e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.090.
76. Dai X., Ma C., Lan Q., Xu T. 3D bioprinted glioma stem cells for brain tumor model and applications of drug susceptibility. *Biofabrication*, 2016, vol. 8, no. 4, art. 045005, pp. 1–11. doi: 10.1088/1758-5090/8/4/045005.
77. Meng F., Meyer C.M., Joung D., Vallera D.A., McAlpine M.C., Panoskaltis-Mortari A. 3D bioprinted in vitro metastatic models via reconstruction of tumor microenvironments. *Adv. Mater.*, 2019, vol. 31, no. 10, art. e1806899, pp. 1–10. doi: 10.1002/adma.201806899.
78. Knowlton S., Onal S., Yu C.H., Zhao J.J., Tasoglu S. Bioprinting for cancer research. *Trends Biotechnol.*, 2015, vol. 33, no. 9, pp. 504–513. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.007.

Для цитирования: Китаева К.В., Ризванов А.А., Соловьева В.В. Современные методы доклинического скрининга противоопухолевых препаратов с применением тест-систем на основе культур клеток // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2021. – Т. 163, кн. 2. – С. 155–176. – doi: 10.26907/2542-064X.2021.2.155-176.

For citation: Kitaeva K.V., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Modern methods of preclinical anticancer drug screening using test systems based on cell cultures. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2021, vol. 163, no. 2, pp. 155–176. doi: 10.26907/2542-064X.2021.2.155-176. (In Russian)