ISSN 2311-4495
ISSN 2410-5155 (Online)
УДК 615.28

МЕТОДЫ ПОДБОРА *IN VITRO* ХИМИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ПАЦИЕНТОВ

Чернов А.Н.[1], Баранцевич Е.П.[1], Калюнов В.Н.[2], Галагудза М.М.[1]

[1]Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, республика Беларусь

Контактная информация:
Александр Николаевич Чернов
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341.
E-mail: al.chernov@mail.ru

Статья поступила в редакцию 07.06.2018 и принята к печати 01.08.2018.

Резюме

В обзоре рассматриваются методы подбора химио- и биопрепаратов, их комбинаций с использованием 2D и 3D моделей культур клеток для прогнозирования персонифицированного ответа пациентов со злокачественными новообразованиями (рак яичников, желудка, кишечника, легкого, молочной, поджелудочной желез, опухоли головы и шеи) на химиотерапию. Приводятся показатели эффективности (чувствительность, специфичность, пролонгирование общей и безрецидивной выживаемости) методов оценки химиочувствительности на культурах опухолевых клеток при сравнении их с эффективностью химиотерапии пациентов. В статье освещаются преимущества и недостатки описываемых методов и перспективы их дальнейшего применения в клинической практике.

Ключевые слова: методы *in vitro* подбора химиопрепаратов, злокачественные опухоли, химиопрепараты, прогнозирование *in vitro* индивидуального ответа на химиотерапию, преимущества и недостатки методов *in vitro*

Для цитирования:
Чернов А.Н., Баранцевич Е.П., Калюнов В.Н., Галагудза М.М. Методы подбора in vitro химиопрепаратов для индивидуальной химиотерапии злокачественных новообразований пациентов. Трансляционная медицина. 2018; 5 (1): 45–65.

THE METHODS OF *IN VITRO* SELECTION OF CHEMOTHERAPEUTIC DRUDS FOR INDIVIDUAL CHEMOTHERAPY OF MALIGANT TUMORS IN PATINETS

Chernov A.N.[1], Barantsevich E.P.[1], Kalunov V.N.[2], Galagudza M.M.[1]

[1] Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia
[2] Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Corresponding author:
Aleksandr N. Chernov
Almazov National Medical Research Centre
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia, 197341
E-mail: al.chernov@mail.ru

Received 07 June 2018; accepted 01 August 2018.

Abstract

The review considers methods for selecting chemo- and biopreparations, their combinations using 2D and 3D cell culture models to predict a personified response of patients with malignant neoplasms (ovarian, stomach, intestine, lung, lacteal, pancreas, head and neck cancer) to chemotherapy. Performance indicators (sensitivity, specificity, prolongation of total and disease-free survival) of chemosensitivity assessment methods in cultures of tumor cells are analyzed on the basis of their comparison with the effectiveness of chemotherapy of patients. The article highlights the advantages and disadvantages of the methods described, the prospects for their further application in clinical practice.

Key words: *in vitro* methods of selection of chemotherapeutic drugs, malignant tumors, chemotherapeutic drugs *in vitro* prediction of an individual response to chemotherapy, advantages and disadvantages of the *in vitro* methods

For citation:
Chernov A.N., Barantsevich E.P., Kalunov V.N., Galagudza M.M. The methods of in vitro selection of chemotherapeutic druds for individual chemotherapy of maligant tumors in patinets. Translyatsionnaya meditsina= Translational Medicine. 2018; 5 (1):45–65. (In Russ.)

Принятые сокращения: PT — пролиферативный тест; EDRA — оценка чрезмерной лекарственной устойчивости; CFA — колониеформирующий анализ; DiSC — дифференциальное окрашивание на цитотоксичность; ATP assay — оценка жизнеспособности клеток по уровню аденозинтрифосфорной кислоты; HTDA — определение лекарственной чувствительности стволовых опухолевых клеток человека; CD-DST — тест восприимчивости к химиопрепаратам культур, инкорпорированных в коллаген-геле; CAM assay — тест адгезии клеток к матриксу; FMCA — флуоресцентный микроанализ культуры на цитотоксичность; SRB — тест с сульфородамином Б; MTT — 3-(4,5-диметилтиазол-2ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид тест, HTCA — клоногенный анализ опухоли человека; CHTCA — капиллярный клоногенный анализ опухоли человека; MiCK — анализ кинетики, индуцированного химиопрепаратами апоптоза в микрокультурах клеток; FCCA –определение химиочувствительности проточной цитометрией; DIMSCAN — полуавтоматическая система обработки флуоресцентных микроскопических цифровых изображений; SCE — обмен сестринскими хроматидами; s-FSC — метод управления системой обратной связи; EVA/PCD — внеорганизменный анализ программированной клеточной гибели; HDRA — метод определения лекарственного ответа гистокультур клеток; 2treat test — метод культивирования опухолевых сфероидов; 3D-TGA — 3D модель опухолевого роста; PFS — безрецидивная и OS — общая выживаемость.

В настоящее время злокачественные новообразования по распространенности, инвалидизации и смертности вышли на второе место после патоло-

гии сердечно-сосудистой системы [1]. По прогнозам Международного агентства по изучению рака (Globocan) и ВОЗ в мире к 2035 г. ежегодная первичная заболеваемость раком возрастет более чем на 70% по сравнению с 2012 г. (14,1 млн. случаев) [2, 3]. По данным тех же организаций в 2015 г. от онкологических заболеваний в мире умерло 8,8 млн. человек, что составило 13% в структуре общей смертности населения планеты [2]. По официальной статистике за 2015 г. в Российской Федерации впервые выявлен 589 341 случай заболеваемости злокачественными новообразованиями и 296 476 смертельных случаев [4].

Развитие онкологии, молекулярной биологии и генетики дало возможность учитывать молекулярно-генетические индивидуальные особенности организма пациента при терапии злокачественных новообразований. Учет этих особенностей позволяет преодолеть общую и перекрестную многофакторную медикаментозную опухолевую резистентность, являющуюся причиной образования вторичных неоплазий, их поликлональной прогрессии и повышения злокачественности [5, 6, 7].

Основными направлениями терапии онкологических заболеваний являются хирургическая резекция, лучевая и полихимиотерапия. Вследствие диффузного характера роста опухолей, их метастазирования и диссеминации раковых клеток, актуальным является совершенствование радиационной и химиотерапии. Однако, применение последней сопряжено с рядом проблем. Развитие множественной общей, перекрестной и плейотропной лекарственной устойчивости злокачественных новообразований, связанной с экспрессией генов и мембранных белков-транспортеров, сопряжено с выведением химиопрепаратов из опухолевых клеток. Низкая проницаемость гематоэнцефалического и гемитестикулярного барьеров [8]. Слабое накопление химиопрепаратов в клетках неоплазий [9]. Индивидуальная выраженность побочных эффектов химиотерапии, включающих интоксикацию, нарушение общего тканевого метаболизма, дерегуляцию эндокринного аппарата, подавление иммунитета, развитие инфекционных осложнений, что в совокупности нередко приводит к инвалидизации пациентов и является главным фактором, препятствующим увеличению терапевтической дозы химиопрепаратов [10]. Отсутствие унифицированных схем применения химиотерапевтических средств [1, 11].

Для повышения эффективности химиотерапии используются методы оценки *in vitro* химиочувствительности неопластических клеток, применяемые в сочетании с другими исследованиями (цитоморфологическим, биохимическим, иммуногистохимическим, молекулярно-генетическим) [12].

Культуральная система не в полной мере воспроизводит условия целостного организма, что надлежит учитывать при интерпретации полученных данных [11]. Отсутствие микроокружения, формирования опухолевой васкуляризации, нарушение межклеточных контактов, отсутствие барьерной функции, иммунной системы способствуют не полному соответствию восприимчивости опухолей к химиопрепаратам, применяемым *in vitro* и результатам, наблюдаемым *in vivo* [13]. Кроме того, химиопрепараты способны вступать во взаимодействие друг с другом, что инициирует развитие синергических, аддитивных и антагонистических эффектов [14].

Тем не менее, благодаря применению культур клеток, представляется возможным установить прямое цитотоксическое действие химиопрепарата или его комбинации (терапевтический индекс) по оценке гибели и/или пролиферативной активности раковых клеток. Использование культуры опухолевых клеток позволяет провести мониторинг химиочувствительности и исследовать механизмы общей медикаментозной и перекрестной резистентности неоплазий в ходе их прогрессии и на разных этапах химиотерапии у больных [11]. Применение моделей *in vitro* позволяет провести скрининг потенциальных и новых противоопухолевых веществ с целью прогнозирования эффективности их применения и исключения неэффективных соединений [11]. Тестирование комбинаций химиотерапевтических средств на культурах клеток дает возможность изучить их аддитивные, синергические или антагонистические эффекты, выбрать наиболее рациональную схему терапии применительно не только к гистологическому типу новообразования, степени его злокачественности, цитологическому, генно-биохимическому статусу, но и индивидуальной чувствительности пациентов [11]. Использование культуральных систем позволяет идентифицировать группу пациентов с повышенным риском рецидива, учитывая клиническую картину, цитологические, иммунохимические, биохимические и молекулярно-генетические показатели [15]. Перечисленные обстоятельства инициировали создание множества методов определения лекарственной чувствительности, устойчивости опухолевых клеток и прогноза их реакции на химиотерапию.

Методы оценки *in vitro* персонифицированной чувствительности неопластических клеток к химиопрепаратам

Будучи отличными по принципиальным подходам, ориентирам и технологиям исполнения, методы, тем не менее, включают одни и те же ба-

зовые принципы: выделение клеток из образцов опухолей, инкубацию посевов с химиопрепаратами, оценку выживаемости, митотического, клоногенного потенциала, ферментативной активности и интерпретацию полученных данных.

Методы оценки химиочувствительности опухолевых клеток с использованием 2D моделей

Пролиферативный тест (proliferative test — PT) показывает степень снижения митотического индекса по включению меченных аминокислот и оснований (^{3}H-тимидин, ^{3}H-уридин, ^{3}H-лейцин, ^{3}H-метионин, ^{135}I-метионин, ^{135}I-бромдексиуридин) во вновь синтезируемую цепь ДНК в пролиферирующих клетках при сцинтилляционном подсчете импульсов на β- и γ-счетчиках с использованием авторадиографии, абсорбционного ридера или проточного цитофлуориметра [16]. Поскольку только делящиеся клетки захватывают метку, то здесь фиксируются инверсионные отношения между поглощением радиоактивности и чувствительностью к химиопрепаратам (табл. 1) [17].

Одним из вариантов данного метода является оценка чрезмерной лекарственной устойчивости (extreme drug resistance assay — EDRA). В этом тесте также применяется ^{3}H-тимидин, но образцы не требуют суспензии одиночных клеток. Измельченную ткань опухолей с помощью ДНКазы и коллагеназы I типа выращивают на агарозном геле и инкубируют с одним или несколькими химиопрепаратами в течение 3-5 сут в дозах 5-80 раз превышающих физиологические. После чего на 48 ч добавляют ^{3}H-тимидин, радиоактивность которого оценивают через равные промежутки времени. Только жизнеспособные, сверхустойчивые к химиопрепаратам клетки захватывают метку. Следовательно, степень поглощения ^{3}H-тимидина прямо коррелирует с резистентностью к химиопрепаратам. Интерпретация результатов уникальна тем, что данный показатель выявляется как противоположный химиочувствительности. По сути метод задуман как средство достижения максимально возможной (более 90%-ной) отрицательной прогностической значимости, которая подтверждает правильность выбранного протокола и минимизирует использование потенциально неэффективных цитостатических средств [18, 19, 20, 21]. Оценка устойчивости к 4-гидроксициклофосфамиду (4-HC) и доксорубицину культур клеток рака молочной железы от 103 пациентов с помощью метода EDRA позволила выявить её корреляцию с безрецидивной (PFS, progression-free survival) и общей (OS, overall survival) выживаемостью пациентов. Период безрецидивной выживаемости был достоверно (P=0,022) короче (48 мес.) в группе пациентов (n=55), опухолевые клетки которых *in vitro* проявляли чрезмерную или умеренную устойчивость к химиопрепаратам в сравнении с группой больных (n=41), в которой раковые клетки имели низкие значения химиоустойчивости (100 мес.). Общая выживаемость пациенток в группе с чрезмерной и умеренной лекарственной резистентностью была достоверно (P=0,011) короче, чем в группе с низкой *in vitro* химиоустойчивостью раковых клеток (табл. 1) [18].

50%-ное ингибирование индекса пролиферации, оцениваемое по иммуногистохимическому окрашиванию антителами на маркер Ki-67 и уровню экспрессии киназы ERK (extracellular signal-regulated kinase), фосфо-ERK (pERK), положено в основу определения чувствительность клеток сквамозоклеточной карциномы головы и шеи к 8 таргетным препаратам (цетуксимаб, эрлотиниб, афатиниб, сорафениб, маситиниб, тивантиниб, понатиниб, рапамицин). Установлена корреляция между уровнем пролиферации, экспрессией pERK/ERK в опухолевых клетках и их чувствительностью к таргетным препаратам [22].

В тесте адгезии клеток к матриксу (cell adhesive matrix — CAM assay) неопластические клетки культивируют 14 сут на покрытых фибронектином или фибринопептидами чашках Петри, затем обрабатывают химиопрепаратами и фиксируют с целью оценки выживаемости. Такой анализ позволяет с 60%-ной точностью предсказать ответ пациентов на химиотерапию [23].

Модель, разработанная Elprana D. et al. (1989), включает выращивание фрагментов сквамозоклеточной карциномы головы и шеи пациента во взвешенном состоянии в тестовой трубке, заполненной ростовой средой с химиопрепаратами (цисплатин, 5-фторурацил). У пациентов, получавших комбинацию препаратов, наблюдалась полная ремиссия в течение 4 мес. [24].

На количественном учете флуоресценции основывается флуоресцентный микроанализ культуры на цитотоксичность (fluorescent microculture cytotoxicity assay — FMCA). В этом методе на клетки линий глиом и первичных опухолей человека воздействуют тельцами (бусинками) и противоопухолевыми препаратами, меченными витальным красителем — гидроэтидином. Жизнеспособные и мертвые клетки подсчитывают с использованием флуоресцентного микроскопа (табл. 1) [25]. Существует и другая модификация метода, в которой первичные культуры клеток (рака желудка, яичников, колоректального рака и хронического лимфоцитарного лейкоза) окрашивают флуоресцеин

Таблица 1. Показатели эффективности методов оценки химиочувствительности на культурах опухолевых клеток

Метод	Тип опухоли	Количество пациентов	Показатель	Источник
Тесты с использованием 2D моделей опухолей				
Пролиферативный тест по включению 3Н-тимидина	рак яичников	25	чувствительность 60%, специфичность 100%	Hetland T. E. et al., 2012, [49]
	рак яичников	108	чувствительность 85%, специфичность 72%	Khoo S. K. et al., 1986, [10]
EDRA	рак яичников и уретры	51	чувствительность 75%, специфичность 100%, достоверная корреляция метода с PFS и OS	Matsuo K. et al., 2010, [96]
	рак молочной железы	103	достоверная корреляция метода с PFS (P=0,0393) и OS (p=0,0327) пациентов.	Mehta R. S. et al., 2001, [18]
Сульфородамин Б	рак яичников	28	чувствительность 62,5%, специфичность 89,5%	Arienti C. et al., 2013, [97]
ATP-TCA/ EDRA	рак яичников	30	чувствительность 96%, специфичность 26,3%	Hetland T.E. et al., 2012, [49]
ATP-TCA	рак яичников	80	чувствительность 88,6%, специфичность 77,8%, достоверная корреляция со стадией опухоли и степенью злокачественности	Zhang J. et al., 2015, [98]
	глиома	30	чувствительность 70–90% , специфичность 90–100%	Linz U. et al., 2014, [51]
	рак молочной железы	496	показатели эффективности теста в зависимости от соединения 25,2–97,4%	Gwe Ahn S.et al., 2014, [99]
	рак яичников	61	чувствительность 60%, специфичность 79%	Neubauer H. et al., 2008, [100]
ATP-TCA	карцинома яичников	100	чувствительность 53-83%, специфичность 90%	Andreotti P.E.et al., 1995, [101]
	рак желудка	36	чувствительность 46,2%, специфичность 95,7%	Kim J.H. et al., 2010, [102]
	рак поджелудочной железы	57	одногодичные и 3-летние показатели PFS в чувствительной к гемцитабину группе (57,4% и 0%) отличались (P<0,017) от устойчивых пациентов (25,3% и 3,6% соответственно).	Park J.S. et al., 2016, [53]
CFA	рак легкого	326	чувствительность 60%, специфичность 91%	Kitten C. M. et al., 1983, [103]
	глиома	470	чувствительность 60%, специфичность 100%	Alonso K, 1984, [8]
	различная этиология	1500	чувствительность 57%, специфичность 92%	Bertelsen C. A. et al., 1984,[104]
	различная этиология	2300	чувствительность 69%, специфичность 91%	Fiebig H. H. et al., 2004, [38]
CD-DST	злокачественная плевральная мезотелиома	26	чувствительность 100%, специфичность 36%, нет достоверной корреляции с клиническим ответом	Higashiyama M. et al., 2008, [105]
	немелкоклеточный рак легкого	80	чувствительность 100%, специфичность 64,7%-72,7%, достоверная корреляция с общей выживаемостью	Kawamura M. et al., 2007. [106]
	различная этиология	554	чувствительность 100%, специфичность 80%	Kobayashi H. et al., 1997, [107]

Метод	Тип опухоли	Количество пациентов	Показатель	Источник
ChemoFX	рак яичников	262	показатель эффективности теста 78,2%. PFS и OS достоверно коррелировали с результатами теста, отнесенными как чувствительные	Tian C. et al., 2014, [108]
	сквамозоклеточная карцинома	285	чувствительность 87% специфичность 58%	Grigsby P.W.et al., 2013, [109]
	рак яичников	147	увеличение выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой группах	Herzog T. J.et al., 2010, [110]
	опухоли желудочно-кишечного тракта (рак желудка, кишечника, яичников, саркомы, мезотелиома, аденокарцинома)	27	чувствительность 63%, нет достоверных отличий (P=0,101 и P=0,403, соответственно) между OS, PFS пациентов в группах, получавших химиотерапию согласно результатам *in vitro* и в группе без оценки химиочувствительности на культуре клеток	Bhagwandin S. et al., 2015, [65]
FMCA	рак яичников	116	чувствительность 76%, специфичность 42%, нет достоверной корреляции между FMCA и ответом пациентов	von Heideman A. et al., 2014, [111]
MTT	рак желудка	353	показатель эффективности теста 88,2%, достоверная корреляция между данными теста и OS	Wu B. et al., 2008, [112]
	колоректальный рак	200	пролонгирование выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой группах	Kabeshima Y.et al., 2002, [113]
	рак яичников	120	пролонгирование выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой группах	Xu X. et al., 2013, [114]
	рак яичников	120	специфичность 83%	Taylor C.G. et al., 2001, [115]
MiCK	рак яичников	104	показатель эффективности теста 71,4%	Salom E. et al., 2012, [39]
Тесты с использованием 3D моделей опухолей				
HDRA	рак яичников	104	PFS достоверно коррелирует с устойчивостью к карбоплатину	Jung P.S. et al., 2013, [116]
	колоректальный рак	324	чувствительность 72,7%, специфичность 54,7%	Yoon Y. S. et al., 2012, [117]
	сквамозоклетчная карцинома головы и шеи	57	чувствительность 79%, специфичность 71%	Pathak K.A.. et al., 2007, [118]
EVA/PCD	немелкоклеточный рак легкого	31	показатель эффективности теста 87,8% достоверное (в 2раза) пролонгирование OS, PFS пациентов	Nagourney R. A. et al., 2012, [82]
CTR-Test	глиома	11	чувствительность 63,4%, специфичность 95%	Linz U. et al., 2014, [51]
Онкобиограм	различные типы тканей	329	чувствительность 77%	Udelnow A. et al., 2013, [47]
Онкограм	колоректальный рак	19	чувствительность 84,6%, специфичность 33,3%	Bounaix Morand du Puch C. et al., 2016, [119]
Сфероиды	рак молочной железы	78	чувствительность 95,5%, специфичность 80,4%	Halfter K. et al., 2015, [120]
3D-гистокультуральный	рак желудка	100	нет достоверного увеличения выживаемости в чувствительной против устойчивой группах	Kodera Y. et al., 2006, [121]

Метод	Тип опухоли	Количество пациентов	Показатель	Источник
3D-гистокультуральный анализ	рак яичников	104	достоверное пролонгирование выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой группах	Jung P.S. et al., 2013, [122]
	колоректальный рак	29	достоверное пролонгирование выживаемости пациентов в чувствительной против устойчивой группах	Furukawa T. et al., 1995, [123]
Сочетания методов, метаанализ				
Различные методы	ретроспективные исследования, различная этиология	2300	чувствительность 69%, специфичность 91%	von Hoff D. D. et al., 1990, [32]
Различные методы	ретроспективные исследования, различная этиология	4092	чувствительность 71,7%, специфичность 90,3%	Blumenthal R.D. et al., 2007, [124]
Различные методы	ретроспективные исследования, различная этиология	1945	чувствительность 80%, специфичность 87,4%	Weisenthal L. M. et al., 2002, [125]
Различные методы	рак яичников	1101	чувствительность 93%, специфичность 46,6%	Kubota T. et al., 2006, [126]
Метаанализ, различные	аденокарцинома, саркома S180, меланома FIII, множественная меланома, карцинома рака яичников, карцинома легкого	1500	чувствительность 80-100%, специфичность 50-80%	Volm M. et al., 2015, [127]

Примечание: во всех приведенных исследованиях использованы первичные культуры клеток, полученные из опухолей пациентов

диацетатом после 3-х сут воздействия препаратов (5-фторурацил, цисплатин, оксалиплатин, иринотекан, митомицин С, доксорубицин, доцетаксел, бортезомиб, сорафениб, сунитиниб и рапамицин) и регистрируют интенсивность флуоресценции, пропорциональную численности жизнеспособных клеток с помощью флуоресцентного микропланшетного ридера Fluoroscan 2 [26]. Это позволяет ускорить скрининг потенциальных противоопухолевых препаратов с помощью прямой оценки количественной флуоресценции минуя процедуру стинцилляционного подсчета.

К разряду косвенных индикаторов чувствительности клеток можно отнести тест с сульфородамином Б (sulforhodamine B assay — SRB) [27]. Он нацелен на верификацию белкового синтеза в результате применения флуоресцентного красителя — сульфородамина Б (SRB), который с высоким сродством связывается с остатками основных аминокислот белков. Затем проводят фиксацию образовавшихся комплексов трихлоруксусной кислотой и колориметрическое определение общего белка, соответствующее количеству жизнеспособных клеток. Кислота способствует связыванию SRB в клетках. В щелочных условиях краситель экстрагируют и после солюбилизации измеряют спектрофотометрически [28]. Метод демонстрирует высокую чувствительность, стабильность конечного результата в монослойных и в суспензионных культурах и не требует дорогостоящих реактивов. Единственное препятствие состоит в необходимости внесения тетрахлоруксусной кислоты. Эта стадия критическая, так как не вполне аккуратное добавление кислоты способствует перемещению клеток до фиксации, порождая возможные артефакты, которые способны отразиться на результатах измерений (табл. 1).

Метод тетразолиевого окрашивания (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide — MTT) дает количественное представление об индексе цитотоксичности (ИЦ). Он основан на способности митохондриальных лактат- и сукцинатдегидрогеназ жизнеспособных клеток конвертировать растворимые натриевые соли тетразолия [2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий]-5-карбоксинилидина (XTT) или 3-[(4,5-диметил-2-тиазол-2,5-дифенил тетразолий] бромида (MTS) в нерастворимый продукт — фармазан в присутствии феназинмоносульфата (PMS). С помощью солюбилизаторов его кристал-

лы переводят в растворимую окрашиваемую форму, оптическая плотность которой улавливается спектрофотометром при длине волн 540-690 нм. Реагируют только жизнеспособные, метаболически активные клетки. Превышение химиопрепаратами эффекта 50%-го торможения роста свидетельствует о восприимчивости клеток к данному препарату. MTS соль лучше растворима и не токсична, в отличие от XTT, поэтому ее применение является предпочтительным. Чувствительность метода лежит в диапазоне от 1000 до 50 000 клеток/лунку (табл. 1) [16, 29, 30]. Интерес представляет исследование китайских ученых, которые применили MTT тест и атомную абсорбционную спектрофотометрию для оценки чувствительности к 5-фторурацилу, доксорубицину, цисплатину, карбоплатину, митомицину и концентрации меди, цинка, селена и марганца в первичных культурах гепатоклеточной карциномы пациентов. Учеными установлена отрицательная корреляция между уровнями селена, марганца и чувствительностью раковых клеток к карбоплатину и доксорубицину соответственно [31]. Таким образом, содержание микроэлементов селена, меди, марганца и цинка в клетках рака печени оказывает влияние на их чувствительность к химиопрепаратам.

Колониеформирующий анализ (colony formation assay — CFA) основывается на клоногенных свойствах стволовых клеток, т.е. их способности в течение 7-21 сут образовывать колонии в монослое [32]. Поскольку некоторые химиопрепараты продолжительно влияют на митотическую активность, целесообразным представляется дополнительный анализ размеров колоний посредством абсорбции ими 1%-го раствора красителя кристаллического фиолетового. Подсчет проводят с помощью камеры Горяева. Эффективным признается химиопрепарат, если после его воздействия жизнеспособными остаются 30% и менее колоний по сравнению с необработанными контролями. Клинические испытания показывают, что примерно половина пациентов, чьи клетки *in vitro* демонстрируют чувствительность к химиопрепаратам, проявляют клинический ответ на те же самые цитостатические средства, а лица, у которых клетки устойчивы к химиопрепаратам крайне редко отвечают на них (табл.1) [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. Fiebig H. H. et al. (2004) показали, что ответы на химиопрепараты опухолей человека, развивающихся как ксенографты у иммунодефицитных мышей, установленные как чувствительные и резистентные, дают корреляцию равную соответственно 62% и 92% [38]. В 80 предпринятых сравнениях совпадение прогнозирования *in vitro* с клиническим ответом для чувствительных и нечувствительных опухолей составило 90% и 97% соответственно. Однако, по другим данным, CFA прогнозирует резистентность к химиопрепаратам у 90% пациентов и чувствительность только у 40-70% пациентов [40]. Таким образом, метод обладает высокой прогностической ценностью для оценки химиочувствительности стандартных и экспериментальных противоопухолевых средств.

Модификацией CFA является клоногенный анализ опухоли человека (human tumour cloning assay — HTCA), разработанный Hamburger A. W. и Salmon S. E (1977). В основу метода положено выращивание на мягком агаре в течение 14-21сут колоний опухолевых клеток, которые обрабатывают химиопрепаратами и оценивают их численность. Поскольку опухолевые клетки человека, обработанные хромомицином A_3 или абрином, не способны расти в культурах, то их используют для верификации [34].

В капилярном клоногенном анализе опухоли человека (capillary human tumour clonogenic cell assay — CHTCA), разработанном Maurer H. R. et al. (1981), используют выращивание колоний раковых клеток в капиллярных трубках с двухслойным агаром при добавлении препаратов. Затем колонии переносят на предметные стекла, где их подсчитывают. Ali-Osman F. et al. оптимизировали HTCA, показав, что он будет иметь лучшие показатели успешного образования колоний и эффективности прикрепления клеток при их выращивании в капиллярах, чем в чашках Петри, используемых в методе HTCA (77% для CHTCA против 53% для HTCA) [41].

Вариантом CFA является метод оценки лекарственной чувствительности стволовых опухолевых клеток человека (human tumor stem cell drug sensitivity assay — HTDA или cancer stem cells sensitivity assay — STELLA). В данной технологии используют 51-суточные колонии раковых стволовых клеток, которые предварительно фенотипируют антителами против CD133, CD166, OCT3/4 (octamer-binding transcription factor ¾), ALDH-1 (aldehyde dehydrogenase 1), CD90 и подвергают 96 ч экспозиции с химио- или таргетными препаратами (адриамицин, афатиниб, винорелбин, гемцитабин, доцетаксел, ифосфамид, карбоплатин, кризотиниб, нилотиниб, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, сорафениб, сунитиниб, темозоломид, топотекан, трастузумаб, 5-фторурацил, цетуксимаб, циклофосфамид, эпирубицин, эрлотиниб, этопозид) с целью оценки их эффективности, прогнозирования влияния на опухоли у пациентов и выбора подходящих терапевтических средств для конкретного

пациента. Противоопухолевый эффект препаратов определяют по индексу ингибирования формирования колоний или в результате окрашивания оранжевым акридиновым и бромистым этидием. Количественную оценку проводят с помощью конфокального микроскопа [42].

Дифференцированное окрашивание клеток на цитотоксичность (differential staining cytotoxicity assay — DiSC) основано на неодинаковом поглощении красителей гематоксилина–эозина нормальными и опухолевыми жизнеспособными клетками, а также прочного зеленого (fast green) погибшими, в зависимости от степени проницаемости их мембран. Интактная плазмолемма препятствует поглощению красителей. Таким образом, удается идентифицировать процент погибших клеток при влиянии химиопрепаратов в диапазоне трех 10-кратных концентраций. Лекарственную восприимчивость измеряют по соотношению выживших клеток в обработанных цитостатическими препаратами посевах к их количеству в необработанных контролях, которое должно составлять не менее 80% жизнеспособных клеток [32, 43, 44]. Эффективным считается химиопрепарат, который в средней концентрации подавляет более чем на 50% жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с контрольными посевами [45].

В микроядерном тесте культивируют клетки первичных опухолей в монослое, обрабатывают их химиопрепаратами или облучением и затем проводят иммуногистохимическое окрашивание для обнаружения микроядер в делящихся клетках. Однако, не было установлено достоверной корреляции между химиочувствительностью раковых клеток в тесте и клиническим ответом опухолей пациентов на химиотерапию [46].

Метод оценки *in vitro* химиочувствительности первичных культур неопластических клеток с использованием гистоцитологического окрашивания по Романовскому-Гимзе применен у 514 пациентов с раком молочной железы, желудка, почки, щитовидной и поджелудочной желез, колоректальным раком и злокачественной меланомой. При сравнении химиочувствительности культур раковых клеток с клиническим ответом опухолей пациентов на химиотерапию удалость достичь достоверного (P=0,0063) пролонгирования показателей общей (OS) выживаемости пациентов в группах «чувствительных *in vitro*» по отношению к группе «резистивных *in vitro*» опухолей [47].

Оценка выживаемости клеток по уровню аденозинтрифосфорной кислоты — АТФ (adenosine triphosphate cell viability assay — ATP assay или adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay — ATP-CRA) способствует количественному подсчету выживших клеток при обработке химиопрепаратами (табл. 1). Погибшие клетки вследствие утраты целостности мембран, демонстрируют значительное уменьшение количества АТФ. После воздействия химиопрепаратов клетки лизируют, а их цитоплазматические компоненты солюбилизируют в условиях, не затрагивающих ферментативного метаболизма АТФ. В лизат вносят АДФ и фермент — люцеферин/люцеферазу, которая катализирует распад АТФ до АДФ или АМФ и люцеферина с испусканием света. Интенсивность свечения пропорциональна метаболической активности субстрата и улавливается люминометром или β-счетчиком. Этот метод позволяет преодолеть ограничения других способов, предоставляя возможность тестировать множество образцов опухолей. Уменьшение АТФ указывает на лекарственную чувствительность, а отсутствие снижения — на устойчивость к химиопрепаратам. Этот анализ пригоден для измерения выживаемости культур с низкой плотностью клеток [47, 48, 49, 50, 51, 52]. Используя данный тест, корейские ученые оценили *in vitro* чувствительность к гемцитабину первичных культур клеток рака поджелудочной железы и обнаружили достоверную корреляцию между химиочувствительностью и возникновением раннего рецидива у 57 пациентов после хирургической резекции и адъювантной химиотерапии. На основе данных ATP-CRA, все пациенты были разделены на 2 группы — «чувствительные» (n=24) и «резистентные» (n=33) к гемцитабину. Одногодичные и 3-летние показатели PFS в «чувствительной» к препарату группе (57,4% и 0,0%) достоверно (P<0,017) отличались от значений в группе «устойчивых» пациентов (25,3% и 3,6% соответственно) [53].

Ряд иных способов опирается на такие критерии как активность ацетилхолинэстеразы, люцеферазы, топоизомеразы-II или секрецию лактатдегидрогеназы, ацетилхолинэстеразы, сукцинатдегидрогеназы и др. [28, 40].

Анализ кинетики, индуцированного химиопрепаратами апоптоза в микрокультурах клеток (Microculture kinetic drug induced apoptosis assay — MiCK). Метод применяется в США для определения наиболее эффективных химиопрепаратов по профилю чувствительности к ним раковых клеток, полученных от пациентов в тканевых, костномозговых и жидкостных образцах. Опухолевый материал экспонируют *in vitro* с разовыми дозами химиопрепаратов. Результаты помогают клиницистам сориентироваться в наиболее предпочтительных химиопрепаратах до начала тера-

пии у конкретного пациента (табл. 1). Данный тест не инвазивен, выполняется на малом объёме опухолевой ткани, жидкости или образцах костного мозга. Метод пока не вошел в рутинную клиническую практику. Хотя ряд публикаций констатировали определенную корреляцию между результатами, полученными *in vitro* и *in vivo* в плане повышения нормы ответа на продиктованную им схему лечения по сравнению с эмпирической [25, 39, 54]. Статистически значимого пролонгирования PFS и OS у онкологических пациентов пока не получено.

Проточно-цитометрическое определение химиочувствительности (flow cytometric chemosensitivity assay — FCCA) выполнено на 30 детях с острым лимфобластоидным лейкозом. Данный метод позволяет количественно оценить число жизнеспособных клеток в суспензии по результатам их флуоресценции при окрашивании флуоресцеиндиацетатом и пропидий иодидом в изотоническом растворе после 1-4 ч экспозиции с химиопрепаратами. Эта технология позволяет быстро и точно определить концентрацию живых клеток в суспензии, отличать жизнеспособные от мертвых клеток, а также бласты при лейкозе от нормальных лейкоцитов в клинических образцах [16, 55, 56].

Проточная цитометрия и оценка пролиферации жизнеспособных мононуклеарных клеток периферической крови по включению в их ДНК флуоресцентного аналога тимидина — 5-этил-2′-деоксиуридин (EdU), меченного азидом Alexa Fluor 488, положены в основу CD анализа деления клеток (CD cell division assay) с целью определения их чувствительности к этопозиду, доксорубицину, цитарабину, митомицину С, ингибиторам ДНК-зависимой протемнкиназы — Nu7441 и ATM — Ku55933. Продолжительность CD анализа составляет 3 сут, что позволяет быстро и надежно оценивать цитостатическое воздействие химиопрепаратов на лимфоциты человека и идентифицировать группу наиболее чувствительных онкогематологических пациентов до назначения противоопухолевой терапии [57].

Оценка чувствительности первичных культур клеток хронического лимфоцитарного лейкоза к комбинациям кладрибин + мафосфамид и флударабин + мафосфамид выполнена с использованием сочетания проточной цитометрии (определение жизнеспособных и апоптотических клеток), иммуноблоттинга (оценка экспрессии белка PARP-1 и скорость апоптоза) и дифференциальной сканирующей калориметрии (изменение конформации хроматина и скорости апоптоза). Комбинированное применение методов позволяет получить достоверную корреляцию между химиочувствительностью *in vitro* клеток лейкоза и клиническим ответом пациентов спустя шесть курсов химиотерапии (через 6 мес) [58].

Тест определения лекарственной чувствительности культур, инкорпорированных в коллаген-геле (collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test — CD-DST). Он способен количественно оценивать чувствительность клеток из биопсийных образцов к противоопухолевым препаратам без контаминации культур фибробластами (табл. 1) [17, 40, 59, 60, 61]. Исследователи из университета Сиги (Япония), используя метод CD-DST, определили скорость ответа на терапию (RR), PFS и OS у 38 пациентов с колоректальным раком (grade IV). Были сформированы 2 группы пациентов, в первой больные получали терапию химиопрепаратами, подобранную с использованием CD-DST, во второй — лечение проводилось без предварительного применения CD-DST. Медианы PFS и OS в первой группе составили соответственно 696,5 и 1023,4 сут против 297,5 и 518,5 сут во второй (P=0,0326, P=0,0061) [60].

Полуавтоматическая система обработки флуоресцентных микроскопических цифровых изображений (semiautomatic fluorescence-based digital image microscopy system — DIMSCAN) основана на регистрации флуоресценции флуоресцеиндиацетата (FDA), избирательно накапливающихся в живых клетках и химического тушения свечения эозина Y погибшими клетками [62]. Метод включает в себя ряд преимуществ. Во-первых, он позволяет сканировать 96-луночный планшет в течение 6 мин даже с единичными флуоресцирующими клетками в каждой лунке. Во-вторых, чувствительность метода лежит в диапазоне 4-5 порядков (от единичных до миллиона клеток), что дает возможность корректно тестировать комбинации лекарственных средств и оценивать их синергические, аддитивные и антагонистические эффекты. Таким образом, эту систему целесообразно использовать для выявления противоопухолевой активности комбинаций химиопрепаратов в предклинических испытаниях [62].

Шведские ученые из Каролинского университета-клиники разработали тест для оценки чувствительности клеток первичных образцов хронического лимфоцитарного лейкоза к 31 малым молекулам и 29 химиопрепаратам на основе флуоресцентной цифровой сканирующей системы. Клетки культивируют в 384-луночных планшетах и подвергают 3 сут воздействию препаратами. После чего оценивают численность жизнеспособных и погибших клеток по окрашиванию их флуоресцентным красителем VitaDye и анализу цифровых

изображений, полученных на флуоресцентном сканере. Наибольшим цитотоксическим воздействием на клетки хронического лимфоцитарного лейкоза обладали ингибиторы белков survivin (YM-155), bcl-2 (ABT-199, ABT-737) и CDK (dinaciclib). Далее проводят цитогенетический анализ клеток хронического лимфоцитарного лейкоза, чтобы выявить хромосомные аберрации (делеция 17p и мутация TP53), в наибольшей степени коррелирующие с химиочувствительностью клеток [63].

В тесте ChemoFx оценку индивидуальной чувствительности к препаратам опухолевых жизнеспособных клеток проводят при их окрашивании красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) и автоматическом подсчете на счетчиках клеток (табл. 1). С использованием этого метода изучена восприимчивость к сунитинибу клеток рака молочной железы, полученных от 39 пациенток. Данный тест позволил соотнести образцы опухолей с ответом на терапию 7,6% — ответившие, 20,5% — имели промежуточную реакцию и 71,7% — не отвечали на лечение [64]. В другом исследовании ChemoFx был применен для оценки чувствительности первичных культур клеток рака желудка, кишечника, яичников, саркомы, мезотелиомы, аденокарциномы, полученных от 27 пациентов, к митомицину С, цисплатину и доксорубицину. Однако, не было установлено достоверных отличий по показателям OS (P=0,101) и PFS (P=0,403) между группами пациентов, получавших химиотерапию согласно результатам *in vitro* и без предварительной оценки химиочувствительности на культуре клеток. Химиочувствительность *in vitro* не коррелировала с типом опухоли или применением предоперационной системной химиотерапии, но коррелировала (P=0,003) с проведением гипертермической интраперитониальной химиотерапии [65].

Технология сканирования клеток (CellScan technology) с использованием лазерного сканирующего цитометра позволяет выявлять антипролиферативные и противоопухолевые свойства новых химических соединений по спектроскопическому и флуоресцентному измерению выживаемости и апоптоза опухолевых клеток [66].

Анализ эксклюзии красителя (dye exclusion assay) [67]. Этот метод основан на принципе непроницаемости цитоплазматической мембраны нетрансформированных клеток для витальных красителей и утрате этой способности погибшими клетками в результате дезинтеграции плазмалеммы. Поэтому жизнеспособные клетки после воздействия химиопрепаратов остаются не окрашенными, а погибшие — захватывают краситель и окрашиваются в соответствующий цвет. Таким образом, удается подсчитать численность жизнеспособных и погибших клеток, и по их соотношению судить о степени цитотоксичности испытуемых химиопрепаратов [28, 45, 56, 67, 68]. При данном способе тестирования применяются различные красители: прочный зеленый, кристаллический фиолетовый, нейтральный красный, эозин, нигрозин Б, акридиновый оранжевый, трипановый синий [56]. Метод эксклюзии красителя относительно скор, прост, малозатратен, обходится небольшим количеством клеток и гарантирует достаточную результативность при соблюдении ряда условий [45, 56, 69].

Метод ChemoID, разработанный американскими учеными из медицинского центра при университете Миссиссипи, позволяет провести определение химиочувствительности раковых стволовых клеток и клеток глиобластомы для индивидуализации выбора химиотерапии у пациентов [70]. Тест ChemoID включает комбинирование методов оценки химиочувствительности опухолевых клеток по их жизнеспособности при окрашивании трипановым синим, флуоресцентно-меченными антителами к маркерам CD133, CXCR4, CD44, Oct3/4, Nanog и WST8 анализа (Water-soluble tetrazolium salts analysis). Флуоресценцию регистрируют на проточном цитометре. К 7 сут культурам клеток добавляют на 2 сут химиопрепараты в 3 концентрациях или их комбинации, а восприимчивость оценивают с помощью WST8 анализа. Чувствительность ChemoID составила 100% для раковых стволовых и опухолевых клеток, а специфичность 97% и 89% соответственно. Данный тест дает возможность по определению времени возникновения рецидива, PFS и OS изучить ответ глиобластомы пациентов на химиотерапию. Оценка *in vitro* чувствительности раковых стволовых клеток к темозоломиду с применением ChemoID позволяет в 2 раза увеличить 12-мес выживаемость пациентов. Медиана возникновения рецидива составила 20 мес для пациентов, у которых в ChemoID тесте погибало более 40% раковых стволовых клеток по сравнению с 3 мес для больных, имеющих меньший процент погибших клеток. Таким образом, ChemoID дает возможность 2,2 раза повысить ответ опухоли у пациентов на химиотерапию по сравнению с группой больных, терапию которым назначают без применения данного метода [70].

Система xCELLigence позволяет определить цитостатическое, цитотоксическое и митогенное воздействие таргетных препаратов (эрлотиниба) и химиопрепаратов (цисплатина), в режиме реального времени с 15 мин интервалом в течение 90 ч. Препараты добавляют через 1 сут к клеткам

аденокарциномы легкого человека, выделенных из злокачественной легочной эффузии. Это дает возможность построить динамические кривые и определить латентный период действия препарата на рост клеток [71].

Воздействие химиопрепаратов повреждает ДНК, активирует ее репарацию и обмен сестринскими хроматидами (sister chromatid exchange — SCE) с помощью гомологичной рекомбинации. Репарационная способность ДНК и генотоксическое воздействие препаратов у каждого пациента индивидуальны, в силу чего может наблюдаться корреляция между частотами SCE и индивидуальной репарационной способностью. Метод SCE основан на дифференциальном окрашивании сестринских хроматид, преимущественно лимфоцитов, которые культивируют с 5-бромдезоксиуридином (5-BrdU). При этом во 2-м делении хромосомы имеют одно плечо с исходной цепью ДНК и другое плечо с включенным 5-BrdU. В результате репликации ДНК, цепи, содержащие 5-BrdU, имеют разрывы и окрашиваются, что позволяет определять кариотипы в 1-м, 2-м и последующих делениях клеток после культивирования [72].

Метод управления системой обратной связи (streamlined feedback system control — s-FSC) применяют для выбора *in vitro* оптимальных комбинаций лекарственных препаратов при их воздействии на жизнеспособность клеточной линии аденокарциномы почки 786-O. Метод основан на использовании линейного регрессионного анализа второго порядка и состоит из трех последовательных этапов. На первой стадии оценивают ингибирование жизнеспособности клеток при воздействии лекарственных препаратов в 91 комбинации. На втором этапе анализируют комбинации четырех химиопрепаратов, проявивших наибольшую эффективность на первом этапе поиска. На последней стадии осуществляют проверку взаимодействия выбранных комбинаций соединений (акситиниб, эрлотиниб, дазатиниб и AZD4547). Эти сочетания препаратов ингибируют жизнеспособность 90% клеток 786-O аденокарциномы почки [73].

В основе метода оценки индивидуального ответа на химиотерапию 5-фторурацилом, доксорубицином и циклофосфамидом 7-ми сут первичной культуры клеток рака молочной железы положена оптимизация получения срезов опухоли, состава и циркуляции культуральной среды. Данный тест включает избыточное удаление жировой ткани, получение 2 мм срезов опухоли и 6-часовое их культивирование с вращением на шейкере в условиях CO_2-инкубатора в среде, содержащей химиопрепараты. Затем срезы фиксируют в формалине, заливают в парафиновые блоки и окрашивают гематоксилином-эозином и антителами к цитокератину (PanCytokeratin), а также проводят оценку гибели и пролиферации клеток соответственно с помощью TUNEL анализа и по включению EdU. Определяют количество EdU- и цитокератин-положительных клеток и абберантую морфологию их ядер с целью выявления гибели клеток (кариолизис, пикноз, кариоррексис и апоптоз) как маркера чувствительности опухолевых образцов на химиотерапию. Применяют 7 разведений окрасок для гистоцитохимии, анализа гибели и пролиферации клеток, чтобы разделить чувствительные и резистивные образцы опухоли [74].

Исследователи из Калифорнийского университета разработали на основе сочетания технологий микролуночного чипа и молекулярной визуализации быстрый (в течение 4 ч) и высокопроизводительный тест для оценки *in vitro* чувствительности клеток рака шейки матки (HeLa) и мочевого пузыря (5637) к химиопрепаратам (цисплатин и паклитаксел). Химиочувствительность раковых клеток определяют при снижении ими внутриклеточного поглощения (2-[N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил) амино]-2-дезокси-D-глюкозы, 2-NBDG) по регистрации интенсивности флуоресценции с помощью программы CellProfiler 2.0 на флуоресцентном микроскопе. Преимуществами данного теста являются не продолжительный период культивирования и быстрота оценки химиочувствительности раковых клеток, которая была сопоставима с MTT, проточной цитометрией и окрашиванием ядер йодидом пропидия [75].

Комбинирование методов оценки химиочувствительности по EC50 (концентрация агента, вызывающего ингибирование на 50% роста клеток) первичных культур клеток аденокарциномы из злокачественной плевральной эффузии немелкоклеточного рака легкого при помощи колориметрического WST-1 теста и генотипирования с использованием секвенирования следующего поколения позволяет целенаправленно и индивидуально подобрать химиопрепараты и провести стратификацию пациентов на подгруппы [76].

Технология Chemocellomics представляет собой высокопроизводительную матрицу для суспензионных микрочастиц и включает химический синтез, иммобилизацию химиопрепарата, прикрепление и рост клеток на микрочипе. Этот тест позволяет оценивать воздействие лекарственных препаратов на первичных культурах опухолевых клеток пациентов в микроколичествах [9].

Сочетание методов определения индекса пролиферации и геномного секвенирования мутаций использовано американскими учеными из Гарвардской

медицинской школы для оценки индивидуального ответа на противоопухолевые препараты культур циркулирующих *ex vivo* клеток метастатического рака молочной железы пациентов и клеточных линий (BRx-07, BRx-33, BRx- BRx-42, BRx-50, BRx-61, BRX-68). Индекс пролиферации и дифференцировку раковых клеток изучают соответственно по окрашиванию на Ki-67 и эпителиальный цитокератин, CD45 маркер. Чувствительность и устойчивость к химиопрепаратам (паклитаксел, капецитабин, доксорубицин), биопрепаратам (фулвестрант, олапариб) и их комбинациям изучают по оценке IC50. Выполняют геномное секвенирование циркулирующих клеток линий рака молочной железы, что позволяет выявить мутации в генах PIK3CA (catalytic subunit alpha phosphatidylinositol-3-kinase, H1047R, G1049R), эстрогенового рецептора (ESR1, estrogen Receptor 1, Y537S), рецептора 2 фактора роста фибробластов (FGFR2, fibroblast growth factor receptor 2), белка p53 (TP53), KRAS, E-кадгенина (CDH1.) Сопоставление профилей генетических мутаций и химиочувствительности дает возможность провести персонифицированный подбор препаратов у пациентов [77].

Методы оценки химиочувствительности опухолевых клеток с использованием 3D моделей

Кроме методов, разработанных на основе 2D технологии культивирования, в последнее время создаются методы оценки индивидуальной химиочувствительности раковых клеток пациентов с применением 3D моделей. В качестве таких модельных систем используются экспланты опухолевой ткани [78], сфероиды, сокультивирование неопластических клеток со стромальными фибробластами и моноцитами [79], органоиды [80] для имитирования микроокружения опухоли *in vivo* [81].

Внеорганизменный анализ программированной клеточной гибели (*ex vivo* analysis of programmed cell death — EVA/PCD) выявляет маркеры апоптотической и неапоптотической гибели клеток (табл. 1). Операционный опухолевый материал дезагрегируют с помощью ДНКазы или коллагеназы IV типа до кластеров (50-100 клеток), которые образуют сфероид. Поскольку клетки в них не пролиферируют, сфероиды создают условия, наиболее приближенные к существующим для опухолей в организме человека. После суточной экспозиции опухолевых сфероидов с испытуемыми химиопрепаратами к ним добавляют смесь красителей, состоящую из нигрозина Б, прочного зеленого и, фиксированных глутаральдегидом, эритроцитов. Образцы окрашивают гематоксилином и эозином. Гибель оценивают при подсчете клеток, дифференциально окрашиваемых сообразно целостности их мембран [28, 82, 83]. Поскольку образование сфероидов классическим путем достаточно сложная и трудоемкая процедура, а некоторые опухоли вообще их не образуют, предлагается выращивание культур клеток в полупроницаемых полимерных микрокапсулах на основе альгинаната и L-полилизина [84].

Метод определения лекарственного ответа гистокультур клеток (histoculture drug response assay — HDRA) основан на степени ингибирования митоза. Для этого метода применяют фрагменты опухолевой ткани размером 1-2 мм (экспланты), которые культивируют на коллагеновой подложке, что позволяет сохранять межклеточные контакты и поддерживать трехмерную архитектуру опухоли. Спустя 24 ч после посева, экспланты инкубируют 3-7 сут с химиопрепаратами и заливают парафином. Критерием оценки цитотоксичности химиопрепаратов служит степень подавления митотической активности клеток, которая оценивается по снижению радиоактивности метки или уменьшению поглощения 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромида (MTT тест, табл. 1) [20, 21, 47, 85, 86, 87, 88].

Шведская биотехнологическая компания OncoTheis разработала 3D тестовую модель OncoCilAir™ с целью оценки химиочувствительности клеток рака легкого. В этой модели совместно культивируют клетки бронхов и опухолевые клетки из хирургических образцов пациентов, чтобы воссоздать модель легкого человека. После дифференцировки культуры сокультивируют с кусочками ткани респираторного эпителия, чтобы воссоздать структуру функциональных легочных узелков. То есть в этой модели учитываются взаимоотношения опухоль-строма. Тест OncoCilAir позволяет оценивать хроническую (3 мес) цитотоксичность, устойчивость, побочные эффекты химиопрепаратов, а также реконструировать различные молекулярные субтипы аденокарциномы легкого в результате присутствия мутаций EGFRdel19, KRAS и эффективно проводить стратификацию пациентов. Наличие мутаций позволяет определять чувствительность раковых клеток к эрлотинибу (тарцева), гефитинибу (иресса) и использовать данный тест в качестве платформы для разработки препаратов [89].

Исследователи из Германии создали на основе одиночных сфероидов 3D модель для оценки индивидуальной реакции на химиотерапию у пациентов со сквамозоклеточной карциномой головы и шеи [90]. Сфероиды получали из FaDu, Cal27, UPCI-SCC-154, PiCa клеточных линий и первичной культуры клеток образцов опухолей пациен-

тов, и затем выращивали в «висячих капелях» или прикрепленными к ультратонкому культуральному планшету. Для получения сфероидов из клеточных линий авторы использовали суспензию одиночных (в количестве 1000-5000) клеток и 3D культуральную платформу. К сфероидам добавляют на 1 сут цисплатин или 5-фторурацил и затем культивируют в их течение 15 сут. Колориметрически определяют пролиферацию и жизнеспособность с применением WST-8 теста, маркера Ki-67 и иммуноферментного анализа (табл. 1). Инкубация сфероидов с химиопрепаратами достоверно уменьшает их размер на всем протяжении эксперимента [90]. Pozzi V. et al. (2015) при 14-28 сут культивировании клеточных линий и первичных культур клеток сквамозоклеточной карциномы головы и шеи получили сквамосферы (squamospheres), т.е. сфероиды, которые могут быть применены для изучения химиочувствительности раковых и стволовых клеток [91].

Метод культивирования опухолевых сфероидов (2treat test) основан на измерении их объёма после воздействия химиопрепаратов или комбинаций с помощью стандартного ДНК микрочипового сканера. Этот тест используют для индивидуального подбора наиболее эффективных схем химиотерапии у пациентов с колоректальным раком [92].

В 3D модели опухолевого роста (three dimensional tumour growth assay — 3D-TGA), в которой эпителиальные клетки рака пищевода совместно культивируют до 3 нед с мезенхимальными стволовыми клетками на экстракте Cultrex® модифицированной базальной мембраны с добавлением глюкозы и поддержанием pH, но без сыворотки (табл. 1). На данной модели Saunders J. H. et al. (2017) оценили воздействие химиопрепаратов и ингибитора деацетилазы гистонов — панобиностата на жизнеспособность раковых клеток по окрашиванию трипановым синем и в результате анализа экспрессии эпителиального маркера EpCam на проточном цитометре. Стволовые клетки конститутивно экспрессируют красный флуоресцентный белок — mCherry в 3D-TGA модели, флуоресценцию которого оценивают с помощью ридера на 3-и и 7-е сут. На 7-е сут кластеры клеток экстаргируют и окрашивают антителами с помощью красителей к Trefoil factor 3, AlexFluor 488 и Prolog Gold Antifade DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole) [93].

Для оценки различий между пациентами в чувствительности к 83 противоопухолевым препаратам неопластических клеток рака ободочной и прямой кишки разработана модель органоидов. Она обнаружила полное совпадение мутаций в органоидах с мутациями в опухоли пациентов в результате секвенирования геномной ДНК. Применение указанной модели позволет выявить новую подгруппу пациентов, содержащих мутации гена *RNF43 (*ring finger protein 43*)*, кодирующего белок поркупин. Использование препаратов, ингибирующих данный протеин, дает возможность проводить терапию данной группы онкологических пациентов [80].

CANScript технология прогнозирования персонифицированного клинического ответа на комбинации противоопухолевых препаратов (доцетаксел, цисплатин и 5-фторурацил, цетуксимаб и þFOLFIRI) испытана на культурах клеток рака кишечника и сквамозоклеточной карциномой головы и шеи, полученных от 109 пациентов. В основе CANScript положено использование эксплантатов опухолей, культивируемых в окружающем стромальном матриксе с аутологичной сывороткой пациентов. Затем проводят патологический и морфологический анализы, оценку пролиферации и гибели клеток. Полученные данные обрабатывают с помощью компьютерного алгоритма CANScript для прогнозирования ответа опухолей пациентов на химиотерапию с 100%-ной чувствительностью и 75–91,67% специфичностью [94].

Стеклянный микрожидкостный чип, в котором поддерживается непрерывная смена среды, моделируя циркуляцию кровотока и диффузию питательных веществ *in vivo*, использован для оценки чувствительности фрагментов сквамозоклеточной карциномы головы и шеи или метастатических лимфатических узлов к 5-фторурацилу, цисплатину или их комбинации. Пролиферацию и апоптотическую гибель клеток оценивают спустя 7 сут вне чипа-матрицы по изменению концентрации лактатдегидрогеназы, WST-1 и цитохрома с. Окраску образцов гематоксилин-эозином проводят, чтобы документировать сходство архитектуры опухоли in vitro с неоплазией, растущей в организме. Указанный метод может быть применен для разработки персонализированных схем химиотерапии у пациентов [95]. Основные показатели эффективности представленных методов и их корреляция с клиническим ответом представлены в таблице 1.

Ограничения методов оценки *in vitro* химиочувствительности на культурах клеток опухолей

Кроме достоинств, рассмотренные методы не лишены технических и теоретических проблем. Точность МТТ подвержена существенному влиянию лабораторных условий и, прежде всего, pH экстрагирующего буфера, так как его смещение на 5 единиц в сторону увеличения порождает ложные сигналы, а модификация состава ведет полному растворению визуализируемых зёрен фармазана [37]. МТТ

обычно выполняют в темноте, так как его реагенты чувствительны к свету, что предвносит некоторое неудобство в проведение эксперимента. Более того, МТТ дает сопоставляемые показатели при наличии в образцах не менее 80% бластных клеток. Если их оказывается меньше, данные сильно искажаются из-за присутствия неопухолевых клеток, способных поглощать тетразолий. Результат признается надежным, когда в контроле сохраняется 70% жизнеспособных клеток на 4 сут культивирования [45]. Большее их количество искажает результаты наблюдений [43]. Диапазон чувствительности МТТ составляет 2 порядка, что ограничивает его использование для оценки синергических эффектов комбинаций химиопрепаратов. Наконец, для МТТ пригодны только адгезионные культуры, причем определенные условия культивирования подбираются для каждой клеточной линии индивидуально. Также МТТ не может применяться для клеток с низким уровнем метаболизма, как, например, тимоцитов или селезёночных макрофагов, которые очень слабо восстанавливают МТТ. Серьезную опасность предвносит ориентация данного метода на сукцинатдегидрогеназу, которая подвергается конкурентному типу торможения. Известно множество соединений, способных конкурировать с этим ферментом за активные центры. Показано, что клетки в состоянии метаболизировать тетразолий до фармазана в безклеточном окружении, что влияет на интерпретацию результатов [128]. Способствует распространению метода его автоматизация [45].

Хотя DiSC анализ (в отличие от МТТ) позволяет использовать материал со значительной примесью нормальных клеток (однако не более 30%) и оценивать эффекты химиопрепаратов в популяциях смешанных клеток, он остается трудоёмким, относительно субъективным и требовательным к уровню квалификации персонала [45, 88].

Проблемность колониеформирующего анализа (CFA) сводится к следующим моментам. При нем, как и в других методах, нарушаются межклеточные взаимоотношения. Имеется вероятность того, что опухолевые клетки в большинстве не пролиферируют (G_0), тогда как делятся колониеобразующие клетки. Не исключено, что колониеобразующие клетки могут оказаться не подлинно стволовыми. CFA в состоянии оценивать численность погибших клеток в узком диапазоне (2 порядка), тогда как клинические ответы требуют, чтобы гибель клеток находилась в широком диапазоне. Это обстоятельство способствует испытанию нереально низких концентраций химиопрепаратов, чтобы избежать ложноположительного результата. Кроме того, выполнение CFA продолжительно по времени (2-4 недели), которое требуется для формирования максимального количества колоний [40]. Рост колоний клеток вносит значительные вариации в результаты их подсчета от одного исследователя к другому отчасти из-за неоднозначности критериев, какие и сколько из них являются оправданными [45]. По выращиванию колоний нельзя оценить изменчивость химиочувствительности субпопуляций опухолевых клеток [40]. Только от 246 пациентов со злокачественными опухолями из 470 (41%) удалось получить клоногенные культуры, пригодные для оценки множественной лекарственной чувствительности к 604 препаратам по причине не одинакового опухолевого роста и других проблем [35]. В целом, метод трудоемкий по подсчетам и неспособен варьировать условия культуральной среды, что удорожает его стоимость. Использование CFA ограничивается плохой клоногенной способностью многих клеточных линий, например, бластных клеток крови [36].

В АТФ анализе нельзя в культуре отличить нормальные от опухолевых клеток. Причем популяция в них должна содержать не менее 70% неопластических клеток для валидации сигнала при отсутствии нормальных клеток, содержащих АТФ [28]. Количество АТФ быстро уменьшается АТФазой в погибших клетках. Однако, АТФ анализ может быть выполнен на опухолевых клетках, полученных из биопсии, плевральной и асцитной жидкости [129].

Красители йодид пропидия и флуоресцеиндиацетат для FCCA являются поздними индикаторами гибели клеток, а феномен наложения флуоресцентных сигналов при тестировании комбинаций препаратов не позволяет изучать явления синергизма и антагонизма [16].

Создание сфероидов при проведении внеорганизменного анализа программированной клеточной гибели (EVA/PCD) является достаточно сложной и трудоемкой задачей, а некоторые клеточные линии вообще не образуют их в суспензии [84].

Метод висячей капли обладает высокой производительностью, автоматизацией, позволяет получить сфероиды одинаковой морфологии и размера, причем каждый сфероид содержится в одной капле, однако, он сопряжен с риском растворения сфероидов [90]. Культивирование клеток на чашках с очень слабой адгезивностью (ULA, ultra-low attachment culture plates) обеспечивает высокую производительность получения сфероидов, автоматизацию (роботы или планшетные ридеры), легкость взятия образцов, однако, оно сочетается с большим, неопределенным количеством образовавшихся сфероидов в каждой лунке, причем их морфология и размеры различаются в широком диапазоне [90].

Метод оценки лекарственной чувствительности стволовых опухолевых клеток человека (HTDA или STELLA) требует длительного времени (51 сут, диапазон 37–95 сут) выполнения и на сегодняшний день существуют очень мало исследований, в которых грамотно проведена вся процедура [42].

Многие методы требуют стадии отмывания от избытка добавляемых веществ. Эти этапы могут быть трудновыполнимыми для суспензионных или плохо адгезионных клеточных культур.

Применение методов в клинической практике

Некоторые методы уже применяются на коммерческой основе. Дифференцированное окрашивание клеток на цитотоксичность (DiSC) применяют в Weisenthal Cancer Group, Huntington Beach, CA, США. Внеорганизменный анализ программированной клеточной гибели (EVA/PCD™) используется в Rational Therapeutics, Long Beach CA, США. С помощью флуоресцентного микроанализа культур на цитотоксичность (FMCA), тимидинового теста (пролиферативный тест, PT), определения лекарственного ответа гистокультур (HDRA) назначают химиотерапию у пациентов в AntiCancer Inc., San Diego, CA, США и SRL Inc., Tokyo, Япония. ChemoFX® тест применяется в Helomics Corp., Pittsburgh, PA, США, а CorrectChemo® — в Diatech Oncology, Franklin, TN, США. Оценку чрезмерной лекарственной устойчивости (EDRA) используют для назначения пациентам химиотерапии в EDRA®, Exiqon Diagnostics, Tustin, CA, США и TherapySelect, Heidelberg, Германия. Сферотест (SpheroTest®) применяют для подбора препаратов у пациентов в SpheroTec, Martinsried, Германия, а онкограм — в Oncomedics, Limoges, Франция.

Заключение

Методы индивидуальной оценки лекарственной чувствительности и устойчивости пока не используются широко в повседневной медицинской практике. Их преимущества в прогнозировании ответа опухолей на терапию, как и предпочтительность продиктованных *in vitro* персонифицированных режимов перед конвентиальными активно обсуждаются. Одни авторы показали преимущества методов индивидуального определения химиочувствительности перед стандартной химиотерапией, и, опираясь на высокую корреляцию ответов на культурах клеток с клиническими (реакция опухолей, состояние пациентов, протяженность периодов безрецидивной и общей выживаемости), высказались в поддержку развития методов [16, 25, 47, 50]. Другие исследователи не смогли выявить преимуществ методов индивидуальной оценки химиочувствительности перед протокольными, и заняли отрицательную позицию [19, 49, 51, 82, 130]. Третьи ученые выявили лишь частичные преимущества в персонифицированном тестировании восприимчивости неопластических клеток к химиопрепаратам и заняли промежуточную позицию [25, 49]. Многие работы из выше цитированных выполнены безупречно.

Однако, нередко наблюдения по сопоставлению результатов *in vitro* и *ex vivo* были малочисленны, а если и имели представительную выборку, то не были грамотно спланированы. Порой в них отсутствуют сведения о длительности безрецидивного и общего выживания пациентов, его качестве, неблагоприятных побочных реакциях, а также не фигурируют рамбомизированные сравниваемые группы [131]. Отсюда проистекает известная сдержанность в общей оценке проблемы. В 2012 г. появился обширный системный обзор [131] членов рабочей группы Американской ассоциации по клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology — ASCO), который посвящен критическому анализу преимуществ методов определения *in vitro* химиотерапии перед групповой. Резюмирующая часть содержит формулировку: «the use chemotherapeutic agents for individual patients is not recommended outside» — «использование химиотерапевтических препаратов для индивидуализации терапии пациентов не рекомендуется объективной реальностью» пока не будет проверено медицинской практикой. В том же осторожном ракурсе позиционируется Национальная всеобщая раковая сеть США (National Comprehensive Cancer Network — NCCN) — клинико-практическая руководящая и направляющая организация. Она признает, что в ряде учреждений научно-лабораторного профиля идентификация лекарственной устойчивости проводится в порядке дополнения к отбору среди находящихся в обращении химиопрепаратов для оптимизации лечения.

Однако следует отметить, что химиочувствительность опухолевых клеток, которая зависит от многих генетических и эпигенетических факторов на уровнях клетки и организма, может выступать в качестве интегративного прогностического показателя ответа опухоли конкретного пациента на проводимую химиотерапию. Данный показатель следует иметь в виду при планировании, проведении и интерпретации результатов комбинированной и комплексной терапии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Merabishvili VM. Oncological statistics (traditional methods, new information technologies): Guidelines for physicians. Part I. SPb.: Costa, 2015. p. 223. In Russian. [Мерабишвили В. М. Онкологическая статистика (традиционные методы, новые информационные технологии): Руководство для врачей. Издание второе, дополненное. Часть I. СПб: Коста, 2015. с. 223].
2. International agency for research of cancer (Globocan) [Electronic resource]: The World of Health Organization, 2012. — Mode of access: http: www.globocan.iarc.fr. (23.03.2018).
3. World health organization [Electronic resource]: World health organization, 2017. Mode of access: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en. (25.04.2018).
4. Malignant tumors in Russia in 2015 (morbidity and mortality). eds by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. M.: MNIOI named. P.A. Herzen. 2017. p. 250. In Russian. [Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена. 2017. с. 250].
5. Chekhun VF. From System biology of cancer to methodology of personalized treatment. Oncology. 2012; 14 (2): 84−88. In Russian. [Чехун В. Ф. От системной биологии рака до методологии персонализированного лечения. Онкология. 2012; 14 (2): 84−88].
6. Oktay MH, Hui P. Molecular pathology as the driving force for personalized oncology. Expert Rev. Mol. Diagnostics. 2012; 12: 811−813.
7. Strese S, Fryknäs M, Larsson R. et al. Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity. BMC Cancer. 2013; 13: 331.
8. Alonso K. Human tumor stem cell assay. A prospective clinical trial. Cancer. 1984; 54: 2475–2479.
9. Broder GR, Birtwell SW, Hagel G, et al. Multiplex bioassays using a suspension array platform; towards the high throughput screening of drugs targeting cancer stem cells. In: 4-th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2010): Groningen, The Netherlands, San Diego, Calif, Red Hook, NY: Chemical and Biological Microsystems Society; Printed from e-media with permission by Curran Associates Inc, 2010; 185–1387.
10. Khoo SK, Hurst T, Webb MJ, et al. Short-term in vitro chemosensitivity testing of tumours of the ovary, cervix and uterus. Measurement of DNA metabolism by ^{3}H-thymidine incorporation. Aust N Z J. Obstet. Gynaecol. 1986; 26: 288–294.
11. Svirnovski AI. Leukemia therapy personalization: role of some laboratory technologies. Medical News. 2013; 9: 6–11. In Russian. [Свирновский А.И. Персонализация терапии лейкозов: роль некоторых лабораторных технологий. Мед. новости. 2013; 9: 6–11].
12. Lv SQ, Kim YH, Giulio F, et al. Genetic alterations in microRNAs in medulloblastomas. Brain Pathol. 2012; 22: 230–239.
13. Ferriss JS, Rice LW. The role of in vitro directed chemotherapy in epithelial ovarian cancer. Reviews in Obstetrics and Gynecology. 2010; 3: 49−54.
14. Pastwa E, Poplawski T, Lewandowska U, et al. Wortmannin potentiates the combined effect of etoposide and cisplatin in human glioma cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2014; 53: 423−431.
15. Yung WK. *In vitro* chemosensitivity testing and its clinical application in human gliomas. Neurosurg. Rev. 1989; 12: 197–203.
16. Galderisi F, Stork L, Li J, Mori M, et al. Flow cytometric chemosensitivity assay as a predictive tool of early clinical response in acute lymphoblastic leukemia. Pediatr. Blood Cancer. 2009; 53: 543−550.
17. Zhai L, Li S, Li X. et al. The nuclear expression of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) in invasive primary breast tumors is associated with chemotherapy sensitivity. Pathol. Res. Pract. 2015; 211: 130−137.
18. Mehta RS, Bornstein R, Yu IR, et al. Breast cancer survival and in vitro tumour response in the extreme drug resistance assay. Breast Cancer Res. Treat. 2001; 66: 225–237.
19. Tiersten AD, Moon J, Smith HO, et al. Chemotherapy resistance as a predictor of progression-free survival in ovarian cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and surgical cytoreduction followed by intraperitoneal chemotherapy: a Southwest Oncology Group Study. Oncology. 2009; 77: 395–399.
20. Lee JH, Um JW, Lee JH, et al. Can immunohistochemistry of multidrug-resistant proteins replace the histoculture drug response assay in colorectal adenocarcinomas? Hepatogastroenterology. 2012; 59: 1075−1078.
21. Lee SW, Kim YM, Kim MB, et al. In vitro chemosensitivity using the histoculture drug response assay in human epithelial ovarian cancer. Acta Medica Okayama. 2012; 66: 271−277.
22. Donnadieu J, Lachaier E, Peria M, et al. Short-term culture of tumour slices reveals the heterogeneous sensitivityof human head and neck squamous cell carcinoma to targeted therapies. BMC Cancer. 2016; 16: 273.
23. Baker FL, Spitzer G, Ajani JA, et al. Drug and radiation sensitivity measurements of successful primary monolayer culturing of human tumor cells using cell-adhesive matrix and supplemented medium. Cancer Res. 1986; 46: 1263–1274.
24. Elprana D, Schwachöfer J, Kuijpers W, et al. Cytotoxic drug sensitivity of squamous cell carcinoma as predicted by an in vitro testing model. Anticancer Res. 1989; 9: 1089–1094.
25. Strickland SA, Raptis A, Hallquist A. Correlation of the microculture-kinetic drug-induced apoptosis assay with patient outcomes in initial treatment of adult acute myelocytic leukemia. Leuk. Lymph. 2013; 54: 528−534.
26. Hultman B, Mahteme H, Sundbom M, et al. Benchmarking of gastric cancer sensitivity to anti-cancer drugs ex vivo as a basis for drug selection in systemic and intraperitoneal therapy. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2014; 33: 110.
27. Skehan P, Storeng R, Scudiero D. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 1990; 82: 1107−1112.
28. Nagourney RA. *Ex vivo* programmed cell death and the prediction of response to chemotherapy. Current Treat. in Options Oncol. 2006; 7: 103−110.
29. Shen W, Hu J-A, Zheng J-Sh. Mechanism of temozolomide-induced antitumor effects on glioma cells. J. of Intern. Medical Res. 2014; 42: 164–172.
30. Zhao Z, He H, Wang C, et al. Downregulation of Id2 increases chemosensitivity of glioma. Tumour Biol. 2015; 36: 4189−4196.

31. Liu Z, Yang W, Long G, et al. Trace elements and chemotherapy sensitivity. Biol. Trace Elem. Res. 2016; 173: 283–290.

32. von Hoff DD, Sandbach JF, Clark GM, et al. Selection of cancer chemotherapy for a patient by an in vitro assay versus a clinician. J. Natl. Cancer Inst. 1990; 82: 110–116.

33. Puck TT, Marcus PI, Cieciura SJ. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. J. Exp. Med. 1956; 103: 273–283.

34. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumour stem cells. Science. 1977; 197: 461–463.

35. von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ, et al. Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. Cancer Res. 1983; 43: 1926–1931.

36. Weisenthal LM, Lippman ME. Clonogenic and nonclonogenic *in vitro* chemosensitivity assays. Cancer Treat. Rep. 1985; 69: 615–632.

37. Wolff JE, Trilling T, Mölenkamp G, et al. Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a metaanalysis. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1999; 125: 481–486.

38. Fiebig HH, Maier A, Burger AM. Clonogenic assay with established human tumour xenografts. Eur. J. Cancer. 2004; 40: 802–820.

39. Salom E, Penalver M, Homesley H, et al. Correlation of pretreatment drug induced apoptosis in ovarian cancer cells with patient survival and clinical response. J. Transl. Med. 2012; 10: 162.

40. Miyazaki R, Anayama T, Hirohashi K, et al. *In vitro* drug sensitivity tests to predict molecular target drug responses in surgically resected lung cancer. PLoS One. 2016; 11: e0152665.

41. Maurer HR, Ali-Osman F. Tumour stem cell cloning in agar-containing capillaries. Naturwissenschaften. 1981; 68: 381–383.

42. D'Arcangelo M, Todaro M, Salvini J, et al. Cancer stem cells sensitivity assay (STELLA) in patients with advanced lung and colorectal cancer: a feasibility study. PLoS One. 2015; 10: e0125037.

43. Kirkpatrick DL, Duke M, Goh TS. Chemosensitivity testing of fresh human leukemia cells using both a dye exclusion assay and a tetrazolium dye (MTT) assay. Leuk. Res. 1990; 14: 459−466.

44. Bosanquet AG, Bell PB, Burlton AR, et al. Correlation of bcl-2 with P-glycoprotein expression in chronic lymphocytic leukaemia and other haematological neoplasms but of neither marker with ex vivo chemosensitivity or patient survival. Leuk. Lymphoma. 1996; 24: 141−147.

45. Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, Macaluso CK. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumours. Cancer Res. 1983; 43: 749–757.

46. Champion AR, Hanson JA, Venables SE, et al. Determination of radiosensitivity in established and primary squamous cell carcinoma cultures using the micronucleus assay. Eur. J. Cancer. 1997; 33: 453–462.

47. Udelnow A, Schönfęlder M, Würl P, et al. *In vitro* chemosensitivity assay guided chemotherapy is associated with prolonged overall survival in cancer patients. Pol. Przegland Chirurg. 2013; 85: 340−347.

48. Ge WQ, Pu JX, Zheng SY. Clinical application of the adenosine triphosphate-based response assay in intravesical chemotherapy for superficial bladder cancer. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2012; 13: 689– 692.

49. Hetland TE, Kærn J, Skrede M, et al. Predicting platinum resistance in primary advanced ovarian cancer patients with an *in vitro* resistance index. Cancer Chemother. Pharmacol. 2012; 69: 1307−1314.

50. Hur H, Kim NK, Min BS, et al. Can a biomarker-based scoring system predict pathologic complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer? Dis. Colon Rectum. 2014; 57: 592−601.

51. Linz U, Ulus B, Neuloh G, et al. Can *in-vitro* chemoresponse assays help find new treatment regimens for malignant gliomas? Anticancer Drugs. 2014; 25: 375−384.

52. Kwon HY, Kim IK, Kang J, et al. *In vitro* adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) as a predictor of clinical response to fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer. Cancer Res. Treat. 2016; 48: 970−977.

53. Park JS, Kim JK, Yoon DS. Correlation of early recurrence with *in vitro* adenosine triphosphate based chemotherapy response assay in pancreas cancer with postoperative gemcitabine chemotherapy. J. Clin. Lab. Anal. 2016; 30: 804–810.

54. Bosserman L, Prendergast F, Herbst R, et al. The microculture-kinetic (MiCK) assay: the role of a drug-induced apoptosis assay in drug development and clinical care. Cancer Res. 2012; 72: 3901−3905.

55. Yokosuka T, Goto H, Fujii H, et al. Flow cytometric chemosensitivity assay using JC-1, a sensor of mitochondrial transmembrane potential, in acute leukemia. Cancer Chemother. Pharmacol. 2013; 72: 1335−1342.

56. Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MC, et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. Braz. J. Med. Biol. Res. 2014; 47: 307−315.

57. Mathew ST, Johansson P, Gao Y, et al. A flow cytometry assay that measures cellular sensitivity to DNA-damaging agents, customized for clinical routine laboratories. Clin. Biochem. 2016; 49: 566–572.

58. Rogalińska M, Błoński JZ, Góralski P, et al. Relationship between in vitro drug sensitivity and clinical response of patients to treatment in chronic lymphocytic leukemia. Int. J. Oncol. 2015; 46: 1259–1267.

59. Higashiyama M, Okami J, Maeda J, et al. Differences in chemosensitivity between primary and paired metastatic lung cancer tissues: in vitro analysis based on the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST). J. Thorac. Dis. 2012; 4: 40–47.

60. Takebayashi K, Mekata E, Sonoda H, et al. Clinical potential of the anticancer drug sensitivity test for patients with synchronous stage IV colorectal cancer. Cancer Chemother. Pharmacol. 2013; 72: 217–222.

61. Sakuma K, Tanaka A, Mataga I. Collagen gel droplet-embedded culture drugsensitivity testing in squamous cell carcinoma cell lines derived from human oral cancers: Optimal contact concentrations of cisplatin and fluorouracil. Oncol. Lett. 2016; 12: 4643−4650.

62. Keshelava N, Frgala T, Krejsa J, et al. DIMSCAN: a microcomputer fluorescence-based cytotoxicity assay for preclinical testing of combination chemotherapy. Methods Mol. Med. 2005; 110: 139−153.

63. Sylvan SE, Skribek H, Norin S, et al. Sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to small targeted therapeutic molecules: an *in vitro* comparative study. Exp. Hematol. 2016; 44: 38–49.

64. Suchy SL, Hancher LM, Wang D, et al. Chemoresponse assay for evaluating response to sunitinib in

primary cultures of breast cancer. Cancer Biol. Ther. 2011; 11: 1059−1064.

65. Bhagwandin S, Naffouje S, Salti G. Utility of chemoresponse assay in patients undergoing cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. Ann. Surg. Oncol. 2015; 22: 2573–2577.

66. Fischer-Fodor E, Moldovan N, Virag P, et al. The CellScan technology for *in vitro* studies on novel platinum complexes with organoarsenic ligands. Dalton Trans. 2008; 45: 6393−400.

67. Giasson J, Chen Y. Mysterious stones. Clin. Chem. *2014;* 60: 274−275.

68. Chou CW, Wang CC, Wu CP, et al. Tumor cycling hypoxia induces chemoresistance in glioblastoma multiforme by upregulating the expression and function of ABCB1. Neurooncol. 2012; 14: 1227−1238.

69. Tsaousis KT, Kopsachilis N, Tsinopoulos IT, et al. Time-dependent morphological alterations and viability of cultured human trabecular cells after exposure to Trypan blue. Clin. Exp. Ophthalmol. 2013; 41: 484−490.

70. Howard CM, Valluri J, Alberico A, et al. Analysis of chemopredictive assay for targeting cancer stem cells in glioblastoma patients. Transl. Oncol. 2017; 2: 241−254.

71. Ruiz C, Kustermann S, Pietilae E, et al. Culture and drug profiling of patient derived malignant pleural effusions for personalized cancer medicine. PLoS One. 2016; 11: e0160807.

72. Mourelatos D. Sister chromatid exchange assay as a predictor of tumor chemoresponse. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ Mutagen. 2016; 803−804: 1−12.

73. Weiss A, Berndsen RH, Ding X, et al. A streamlined search technology for identification of synergistic drug combinations. Sci Rep. 2015; 5: 14508.

74. Naipal KA, Verkaik NS, Sánchez H, et al. Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. BMC Cancer. 2016; 16: 78.

75. Wang MS, Luo Z, Nitin N. Rapid assessment of drug response in cancer cells using microwell array and molecular imaging. Anal. Bioanal. Chem. 2014; 406: 4195–4206.

76. Roscilli G, De Vitis C, Ferrara FF, et al. Human lung adenocarcinoma cell cultures derived from malignant pleural effusions as model system to predict patients chemosensitivity. J. Transl. Med. 2016; 14: 61.

77. Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy. *Ex vivo* culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. Science. 2014; 345: 216−220.

78. Karekla E, Liao WJ, Sharp B, et al. *Ex vivo* explant cultures of non-small cell lung carcinoma enable evaluation of primary tumor responses to anticancer therapy. Cancer Res. 2017; 77: 2029−2039.

79. Yamazoe H, Hagihara Y, Kobayashi H. Multicomponent coculture system of cancer cells and two types of stromal cells for *in vitro* evaluation of anticancer drugs. Tissue Eng. Part C Methods. 2016; 22: 20−29.

80. van de Wetering, Francies HE, Bounova G, et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. Cell. 2015; 161: 933–945.

81. Xu Z, Gao Y, Hao Y, et al. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. Biomaterials. 2013; 34: 4109−4117.

82. Nagourney RA, Blitzer JB, Shuman RL, et al. Functional profiling to select chemotherapy in untreated, advanced or metastatic non-small cell lung cancer. Anticancer Res. 2012; 32: 4453−4460.

83. Kiyohara Y, Yoshino K, Kubota S, et al. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. Cancer Sci. 2016; 107: 452−460.

84. Tsoy AM, Zaytseva-Zotova DS, Edelweiss EF, et al. Microencapsulated multicellular tumor spheroids as a novel in vitro model for drug screening. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2010; 4: 243–250. In Russian. [Цой А.М., Зайцева-Зотова Д.С., Эдельвейс Э.Ф. и др. Микрокапсулированные мультиклеточные опухолевые сфероиды: получение и использование в качестве модели *in vitro* для тестирования лекарств. Биомед. химия. 2010; 56(6): 674–685].

85. Leighton JA. Sponge matrix method for tissue culture; formation of organized aggregates of cells *in vitro*. J. Natl. Cancer Inst. 1951; 12: 545–561.

86. Sherwin RP, Richters A, Yellin AE, et al. Histoculture of human breast cancers. J. Surg. Oncol. 1980; 13: 9–20.

87. Kato R, Hasegawa K, Achiwa Y, et al. Predicting nedaplatin sensitivity of cervical cancer using the histoculture drug response assay. Eur. J. Gynaecol. Oncol. 2011; 32: 381−386.

88. Su Y. Cancer chemosensitivity testing review. J. Cancer Ther. 2014; 5: 672−679.

89. Mas C, Boda B, Caul Futy M, et al. Establishment of a tumour-stroma airway model (OncoCilAir) to accelerate the development of human therapies against lung cancer. Altern. Lab. Anim. 2016; 44: 479−485.

90. Hagemann J, Jacobi C, Hahn M, et al. Spheroid-based 3D cell cultures enable personalized therapy testing and drug discovery in head and neck cancer. Anticancer Res. 2017; 37: 2201−2210.

91. Pozzi V, Sartini D, Rocchetti R, et al. Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Cell. Physiol. Biochem. 2015; 36: 784–798.

92. Horizon 2020 newsroom editor. Better combination therapies for colorectal cancer patients. http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/news/better-combination-therapies-colorectal-can cer-patients. (14 Sep 2015).

93. Saunders JH, Onion D, Collier P, et al. Individual patient oesophageal cancer 3D models for tailored treatment. Oncotarget. 2017; 8: 24224−24236.

94. Majumder B, Baraneedharan U, Thiyagarajan S, et al. Predicting clinical response to anticancer drugs using an ex vivo platform that captures tumour heterogeneity. Nat. Commun. 2015; Vol. 6: 6169.

95. Hattersley SM, Sylvester DC, Dyer CE, et al. A microfluidic system for testing the responses of head and neck squamous cell carcinoma tissue biopsies to treatment with chemotherapy drugs. Ann. Biomed. Eng. 2012; 40: 1277–1288.

96. Matsuo K, Bond VK, Im DD, et al. Prediction of chemotherapy response with platinum and taxane in the advanced stage of ovarian and uterine carcinosarcoma: a clinical implication of *in vitro* drug resistance assay. Am. J. Clin. Oncol. 2010; 33: 358–363.

97. Arienti C, Tesei A, Verdecchia GM, et al. Role of conventional chemosensitivity test and tissue biomarker expression in predicting response to treatment of peritoneal carcinomatosis from colon cancer. Clin. Colorectal Cancer. 2013; 12: 122–127.

98. Zhang J, Li H. Heterogeneity of tumor chemosensitivity in ovarian epithelial cancer revealed using the adenosine triphosphate tumor chemosensitivity assay. Oncol. Lett. 2015; 9: 2374–2380.

99. Gwe Ahn S, Ah Lee S, Woo LH, et al. *In vitro* chemoresponse assay based on the intrinsic subtypes in breast cancer. Jpn. J. Clin. Oncol. 2014; 44: 624–631.

100. Neubauer H, Stefanova M, Solomayer E, et al. Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. Anticancer Res. 2008; 28: 949–955.

101. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, et al. Chemosensitivity testing of human tumours using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. Cancer Res. 1995; 55: 5276–5282.

102. Kim JH, Lee KW, Kim YH, et al. Individualized tumor response testing for prediction of response to paclitaxel and cisplatin chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. J. Korean Med. Sci. 2010; .25: 684–690.

103. Kitten CM, von Hoff DD, Bennett EV Jr, et al. The human tumor clonogenic assay in the treatment of patients with lung cancer. Ann. Thorac. Surg. 1983; 36: 408–410.

104. Bertelsen CA, Sondak VK, Mann BD, et al. Chemosensitivity testing of human solid tumors. A review of 1582 assays with 258 clinical correlations. Cancer. 1984; 53: 1240–1245.

105. Higashiyama M, Oda K, Okami J, et al. *In vitro* chemosensitivity test using the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST) for malignant pleural mesothelioma: Possibility of clinical application. Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2008; 14: 355–362.

106. Kawamura M, Gika M, Abiko T, et al. *C*linical evaluation of chemosensitivity testing for patients with unresectable non-small cell lung cancer (NSCLC) using collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST). Cancer Chemother. Pharmacol. 2007; 59: 507–513.

107. Kobayashi H, Tanisaka K, Doi O, et al. An *in vitro* chemosensitivity test for solid human tumors using collagen gel droplet embedded cultures. Int. J. Oncol. 1997; 11: 449–455.

108. Tian C, Sargent DJ, Krivak TC, et. al. Evaluation of a chemoresponse assay as a predictive marker in the treatment of recurrent ovarian cancer: Further analysis of a prospective study. Br. J. Cancer. 2014; 111: 843–850.

109. Grigsby PW, Zighelboim I, Powell MA, et al. *In vitro* chemoresponse to cisplatin and outcomes in cervical cancer. Gynecol. Oncol. 2013; 130: 188–191.

110. Herzog TJ, Krivak TC, Fader AN, et al. Chemosensitivity testing with ChemoFx and overall survival in primary ovarian cancer. Am. J. Obstet. Gynecol. 2010; 203: e1–6.

111. von Heideman A, Tholander B, Grundmark B, et al. Chemotherapeutic drug sensitivity of primary cultures of epithelial ovarian cancer cells from patients in relation to tumour characteristics and therapeutic outcome. Acta Oncol. 2014; 53: 242–250.

112. Wu B, Zhu JS, Zhang Y, et al. Predictive value of MTT assay as an *in vitro* chemosensitivity testing for gastric cancer: one institution's experience. World J. Gastroenterol. 2008; 14: 3064–3068.

113. Kabeshima Y, Kubota T, Watanabe M, et al. Clinical usefulness of chemosensitivity test for advanced colorectal cancer. Anticancer Res. 2002; 22: 3033–3037.

114. Xu X, Dai H, Zhao Y. et al. *In vitro* chemosensitivity assay of ascites in epithelial ovarian cancer. Eur J. Gynaecol. Oncol. 2013; 34: 559–564.

115. Taylor CG, Sargent JM, Elgie AW, et al. Chemosensitivity testing predicts survival in ovarian cancer. Eur. J. Gynaecol. Oncol. 2001; 22: 278–282.

116. Jung PS, Kim DY, Kim MB, et al. Progression-free survival is accurately predicted in patients treated with chemotherapy for epithelial ovarian cancer by the histoculture drug response assay in a prospective correlative clinical trial at a single institution. Anticancer Res. 2013; 33: 1029–1034.

117. Yoon YS, Kim CW, Roh SA, et al. Applicability of histoculture drug response assays in colorectal cancer chemotherapy. Anticancer Res. 2012; 32: 3581–3586.

118. Pathak KA, Juvekar AS, Radhakrishnan DK, et al. *In vitro* chemosensitivity profile of oral squamous cell cancer and its correlation with clinical response to chemotherapy. Indian J. Cancer. 2007; 44: 142–146.

119. Bounaix Morand du Puch C, Nouaille M, Giraud S, et al. Chemotherapy outcome predictive effectiveness by the Oncogramme: Pilot trial on stage-IV colorectal cancer. J. Transl. Med. 2016; 14: 10.

120. Halfter K, Ditsch N, Kolberg HC, et al. Prospective cohort study using the breast cancer spheroid model as a predictor for response to neoadjuvant therapy — The SpheroNEO study. BMC Cancer. 2015; 15: 519.

121. Kodera Y, Ito S, Fujiwara M, et al. *In vitro* chemosensitivity test to predict chemosensitivity for paclitaxel, using human gastric carcinoma tissues. Int. J. Clin. Oncol. 2006; 11: 449–453.

122. Jung PS, Kim DY, Kim MB, et al. Progression-free survival is accurately predicted in patients treated with chemotherapy for epithelial ovarian cancer by the histoculture drug response assay in a prospective correlative clinical trial at a single institution. Anticancer Res. 2013; 33: 1029–1034.

123. Furukawa T, Kubota T, Hoffman RM. Clinical applications of the histoculture drug response assay. Clin Cancer Res. 1995; 1: 305–311.

124. Blumenthal RD, Goldenberg DM. Methods and goals for the use of *in vitro* and *in vivo* chemosensitivity testing. Mol. Biotechnol. 2007; 35: 185–197.

125. Weisenthal LM, Nygren P. Current status of cell culture drug resistance testing (CCDRT). 2002. Available from: https://www.researchgate.net/ publication/237347352. (08.12.2015).

126. Kubota T, Weisenthal L. Chemotherapy sensitivity and resistance testing: to be "standard" or to be individualized, that is the question. Gastric. Cancer. 2006; 9: 82–87.

127. Volm M, Efferth T. Prediction of cancer drug resistance and implications for personalized medicine. Front Oncol. 2015; 5: 282.

128. Peng TC, Wang CC, Kao TW. et al. Relationship between hyperuricemia and lipid profiles in US adults. Biomed. Res. Int. 2015; 2015: 127596.

129. Chen F, Cushion MT. Use of an ATP bioluminescent assay to evaluate viability of Pneumocystis carinii from rats. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2791–2800.

130. Huh WK, Cibull M, Gallion HH, et al. Consistency of *in vitro* chemoresponse assay results and population clinical response rates among women with endometrial carcinoma. Int. J. Gynecol. Cancer. 2011; 21: 494–499.

131. Burstein HJ, Mangu PB, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays. J. Clin. Oncol. 2011; 29: 3328−3330.

Информация об авторах:

Чернов Александр Николаевич, научный сотрудник отдела микробиологии, клеточных технологий и молекулярной биологии Центра доклинических и трансляционный исследований Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»;

Баранцевич Елена Петровна, д.м.н., заведующая НИО микробиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»;

Калюнов Владимир Николаевич, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»;

Галагудза Михаил Михайлович, д.м.н., член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»;

Author information:

Aleksandr N. Chernov, researcher, the department of microbiology, Almazov National medical research centre;

Elena P. Barantsevich, Dr. Sci., head of the department of microbiology, Almazov National medical research centre;

Vladimir N. Kalunov, Dr. Sci.,Prof., leading researcher, laboratory of neurophysiology, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus;

Mikhail M. Galagudza, Dr. Sci., Prof., head of the Experimental medicine Institute, Almazov National medical research centre.