

R., Aquino, V., Salgado, J., Pasalodos, S., Miranda, M., Alonso, A., & Dopazo, J. (2020). SMN1 copy-number and sequence variant analysis from next-generation sequencing data. *Human mutation*, 41(12), 2073–2077. <https://doi.org/10.1002/humu.24120>

16. Alves, C., Zhang, R., Johnstone, A.J., Garner, R., Nwe, P.H., Siranosian, J.J., & Swoboda, K.J. (2020). Serum creatinine is a biomarker of progressive denervation in spinal muscular atrophy. *Neurology*, 94(9), e921–e931. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008762>

17. Freigang, M., Wurster, C.D., Hagenacker, T., Stolte, B., Weiler, M., Kamm, C., Schreiber-Katz, O., Osmanovic, A., Petri, S., Kowski, A., Meyer, T., Koch, J.C., Cordts, I., Deschauer, M., Lingor, P., Aust, E., Petzold, D., Ludolph, A. C., Falkenburger, B., Hermann, A., Günther, R. (2021). Serum creatine kinase and creatinine in adult spinal muscular atrophy under nusinersen treatment. *Annals of clinical and translational neurology*, 8(5), 1049–1063. <https://doi.org/10.1002/acn3.51340>

18. Yuan, A., Rao, M.V., Veeranna, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(4), a018309. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018309>

19. Kobayashi, D.T., Shi, J., Stephen, L., Ballard, K.L., Dewey, R., Mapes, J., Chung, B.,

McCarthy, K., Swoboda, K.J., Crawford, T.O., Li, R., Plasterer, T., Joyce, C., Biomarkers for Spinal Muscular Atrophy Study Group, Chung, W.K., Kaufmann, P., Darras, B.T., Finkel, R.S., Sproule, D.M., Martens, W.B., Chen, K.S. (2013). SMA-MAP: a plasma protein panel for spinal muscular atrophy. *PLoS one*, 8(4), e60113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060113>

20. Kolb, S.J., Coffey, C.S., Yankey, J.W., Krossschell, K., Arnold, W.D., Rutkove, S.B., Swoboda, K.J., Reyna, S.P., Sakonju, A., Darras, B.T., Shell, R., Kuntz, N., Castro, D., Iannaccone, S. T., Parsons, J., Connolly, A.M., Chiriboga, C.A., McDonald, C., Burnette, W.B., Werner, K. NeuroNEXT Clinical Trial Network and on behalf of the NN101 SMA Biomarker Investigators (2016). Baseline results of the NeuroNEXT spinal muscular atrophy infant biomarker study. *Annals of clinical and translational neurology*, 3(2), 132–145. <https://doi.org/10.1002/acn3.283>

21. Alves, C., Zhang, R., Johnstone, A.J., Garner, R., Nwe, P.H., Siranosian, J.J., & Swoboda, K.J. (2020). Serum creatinine is a biomarker of progressive denervation in spinal muscular atrophy. *Neurology*, 94(9), e921–e931. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008762>

22. Querin, G., Lenglet, T., Debs, R., Stojkovic, T., Behin, A., Salachas, F., Le Forestier, N., Amador, M., Lacomblez, L., Meininger, V., Bruneteau, G., Laforêt, P., Blancho, S., Marchand-Pauvert,

V., Bede, P., Hogrel, J.Y., & Pradat, P.F. (2018). The motor unit number index (MUNIX) profile of patients with adult spinal muscular atrophy. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 129(11), 2333–2340. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2018.08.025>

23. Weng, W.C., Hsu, Y.K., Chang, F.M., Lin, C.Y., Hwu, W.L., Lee, W.T., Lee, N.C., & Chien, Y.H. (2021). CMAP changes upon symptom onset and during treatment in spinal muscular atrophy patients: lessons learned from newborn screening. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 23(2), 415–420. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-00987-w>

24. Kariyawasam, D., D'Silva, A., Howells, J., Herbert, K., Geelan-Small, P., Lin, C.S., & Farrar, M.A. (2020). Motor unit changes in children with symptomatic spinal muscular atrophy treated with nusinersen. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 92(1), 78–85. Advance online publication. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-324254>

25. Nandedkar, S.D., Barkhaus, P.E., & Stålberg, E. V. (2010). Motor unit number index (MUNIX): principle, method, and findings in healthy subjects and in patients with motor neuron disease. *Muscle & nerve*, 42(5), 798–807. <https://doi.org/10.1002/mus.21824>

В.А. Маркелов, К.В. Данилко, Т.И. Биккузин, А.А. Рахимов, А.А. Валиев

3D-МОДЕЛИ ДЛЯ АНАЛИЗА ИНФИЛЬТРАЦИИ ОПУХОЛИ МОНОЦИТАМИ-МАКРОФАГАМИ

DOI 10.25789/YMJ.2023.84.29

УДК 57.085.23

Представлен аналитический обзор литературных данных современных исследований миграции (движения) моноцитов в опухолевом микроокружении с использованием различных трехмерных моделей миграции моноцитов в опухолевом микроокружении. Приведённые литературные данные могут выступать в качестве характеристики трехмерных моделей как оптимальной платформы для изучения функций как отдельных клеточных популяций иммунных клеток, так и целых клеточных ансамблей при развитии и терапии злокачественных новообразований. Одной из важнейших характеристик трёхмерной модели, оказывающих значительное влияние на прогностическую способность, является её клеточный состав. Приведённые данные чётко свидетельствуют о важности многообразия типов клеток используемых моделей, включая введение стромальных клеток (в частности фибробластов). Не менее высокое значение для прогностической способности имеют различные типы опухолевых клеток и их отдельные клеточные линии. Помимо самих компонентов, используемых для создания трехмерной модели, важное значение имеет характер организации вышеуказанных компонентов (различных типов и популяций клеток, а также структурные внеклеточные компоненты). Таким образом, настоящий аналитический обзор демонстрирует важность дальнейшей оптимизации трехмерных опухолевых моделей с целью получения ещё более эффективных средств воспроизведения нативной структуры опухолевого микроокружения.

Ключевые слова: трехмерный матрикс, моноциты, опухолевое микроокружение.

МАРКЕЛОВ Виталий Андреевич – аспирант ИБГ УФИЦ РАН, м.н.с. Института фундаментальной медицины Башкирского ГМУ, г. Уфа, marckelow.vitalick2017@yandex.ru; **ДАНИЛКО Ксения Владимировна** – к.б.н., доцент, и.о. зав. лаб. Института фундаментальной медицины БГМУ Минздрава России, kse-danilko@yandex.ru; **БИККУЗИН Тимур Ильдусович** – с.н.с. Института фундаментальной медицины Башкирского ГМУ, timur@bikkuzin.ru; **РАХИМОВ Артур Ашатович** – к.ф.-м.н., с.н.с. ЦНИЛ Башкирского ГМУ, н.с. Института механики им. Р.Р. Мавлютова УФИЦ РАН, ragar83@mail.ru; **ВАЛИЕВ Азат Ахматович** – н.с. ЦНИЛ Башкирского ГМУ, м.н.с. Института механики им. Р.Р. Мавлютова УФИЦ РАН, azatphysic@mail.ru.

An analytical review of literature data of modern studies of monocyte migration (movement) in tumor microenvironment using various three-dimensional models of monocyte migration in tumor microenvironment is presented. The given literature data can serve as a characteristic of three-dimensional models as an optimal platform for studying the functions of both individual cell populations of immune cells and whole cell ensembles in the development and therapy of malignant neoplasms. One of the most important characteristics of a three-dimensional model, which has a significant impact on its prognostic ability, is the cellular composition used. The given data clearly demonstrate the importance of the diversity of cell types of the used models, including the introduction of stromal cells (in particular, fibroblasts). Various cell types form a complex system of interactions, thus forming three-dimensional models closest to native organismal conditions. Different types of tumor cells and their individual cell lines are of no less high importance for prognostic ability. For example, tumor spheroids that contain different types of cancer cells show a different secretory profile. As such, the pattern of monocyte infiltration and polarization may differ depending on the type of tumor cell line. In addition to the components themselves used to create the 3D model, the nature of the organization of the above components (different cell

types and populations, as well as structural extracellular components) is important. Therefore, this analytical review contains a separate structural section including the analysis of the diversity of structural groups of three-dimensional tumor models. Among the variety of the mentioned structural groups the following should be mentioned: suspensions of multicomponent cancer spheroids, various variants of microfluidic systems and a separate group of organoids - miniature models of native organs and tissues. Thus, this analytical review demonstrates the importance of further optimization of three-dimensional tumor models in order to obtain even more effective means of reproducing the native structure of the tumor microenvironment.

Keywords: three-dimensional matrix, monocytes, tumor microenvironment.

Введение. Изучение сложнейшей структуры микроокружения опухоли включает анализ взаимодействий между раковыми клетками, стромальным компонентом и клетками иммунной системы. В свою очередь, исследования с использованием трёхмерных моделей позволяют производить более точный анализ структуры микроокружения опухоли и взаимодействия отдельных её элементов друг с другом в сравнении с классическими двумерными моделями. Многочисленные исследования убедительно демонстрируют связь характера межклеточных взаимодействий с прогрессированием злокачественных солидных опухолей [32]. В последние годы сложность микроокружения опухоли была воспроизведена в передовых трёхмерных моделях на основе клеточных культур. В то время как модели *in vivo* являются дорогостоящими и трудоёмкими в разработке, классические 2D-модели *in vitro* не могут в достаточной степени повторить пространственно-временную динамику, характерную для физиологических условий *in vivo* [3], трёхмерные модели обладают способностью в большей степени воспроизводить архитектуру и метаболизм исходной ткани [16]. При этом происходит перманентное улучшение и специализация трёхмерных моделей в зависимости от исходных данных и конечных целей исследований, среди которых можно отметить включение различных белков внеклеточного матрикса или добавление различных типов поддерживающих клеток и создание ангиогенной среды [15, 19, 23].

Как правило, существующие трёхмерные модели опухолевого микроокружения фокусируются на взаимодействии раковых клеток и их производных со стромальными клетками, такими как фибробласты, однако накопление все большего количества новых данных показывает значительную актуальность исследований взаимодействия элементов иммунной системы и микроокружения опухоли [32]. Действительно, современные многокомпонентные трёхмерные модели клеточных культур могут быть оптимальной платформой для изучения

роли иммунной системы в злокачественных новообразованиях. Наглядным примером этого служит исследование К. Heungham с использованием трёхмерных моделей мезотелиомы, которое воспроизводит изменения сложных сетей биомаркеров, ассоциированных с иммунным ответом и апоптозом [21].

Роль различных клеточных популяций для прогностической способности трёхмерных опухолевых моделей. Развитие злокачественного новообразования способствует качественному изменению клеток врожденного и адаптивного иммунитета. Известно, что моноциты могут дифференцироваться в два функционально различных подтипа макрофагов: классические противовоспалительные макрофаги, известные как M1-подобные и M2-подобные макрофаги, которые, как известно, ассоциированы с прогрессированием опухоли посредством ремоделирования внеклеточного матрикса и стимулирования ангиогенеза [32]. В контексте настоящего исследования значительный интерес вызывают результаты использования существующих трёхмерных клеточных моделей для анализа сложной системы взаимодействий моноцитов, макрофагов, раковых клеток и их микроокружения.

На данный момент классическим типом трёхмерных моделей являются сферические клеточные структуры (сфероиды). По происхождению клеток выделяют следующие типы сфероидных моделей: модель многоклеточной опухоли с использованием клеточных линий, онкосфероиды из клеток диссоциированной солидной опухоли, тканевые опухолевые сферы, сформированные путем частичной диссоциации солидной опухоли, и органотипические многоклеточные сфероидные модели, отличающиеся от предыдущей модели отсутствием тканевой диссоциации. Последние две модели предполагают размытие между понятиями «сфероид» и «органонид». Тем не менее, термин «сфероид» является наиболее используемым для обозначения трёхмерных культур клеток, включающий многокомпонент-

ные суспензии первичных клеток или клеточных линий [8].

Анализ трёхмерных сфероидных моделей культуры клеток рака прямой кишки человека (клеточная линия HRT-18), сформированных в агарозных лунках, показал ассоциацию макрофагов с поверхностью сфероидов в течение 24 ч, с их последующей инфильтрацией и распадом в отсутствие выраженной цитотоксичности после 5 дней совместного культивирования. Также раковые сфероиды показали интенсификацию миграции в присутствии противовоспалительных макрофагов по сравнению с противовоспалительными и резидентными макрофагами в коллагеновом субстрате [32]. Анализ рекрутирования моноцитов периферической крови при помощи трёхмерных сфероидных моделей фибробластов в агарозных лунках показал, что инфильтрация моноцитов характерна для раковых сфероидных моделей фибробластов, тогда как обычные модели сфероидов фибробластов показали низкую степень инфильтрации [35]. Равным образом для сфероидных моделей клеток рака молочной железы, содержащих фибробласты, была показана более высокая скорость миграции моноцитов относительно моделей без них [17], что поднимает вопрос о раковых и стромальных клетках как основах для рекрутирования иммунных клеток. Однако данные результаты не подтвердились в исследованиях плоскоклеточного рака головы и шеи (далее ПРГШ), так как не было зафиксировано значительных различий в интенсивности инфильтрации мононуклеарными клетками периферической крови (далее МПК) фибробластных сфероидных моделей клеток ПРШГ и сфероидных моделей клеток ПРГШ без фибробластов. При этом при увеличении количества МПК наблюдалось увеличение их концентрации на поверхности сфероидных моделей без дальнейшей инфильтрации. Тем не менее, экспериментальное подавление экспрессии рецептора эпителиального фактора роста приводило к усилению инфильтрации [5].

Исследования с использованием трёхмерных сфероидных моделей

клеток рака молочной железы (клеточная линия SUM159PT) показали значительную инфильтративную способность макрофагов, опосредованную деятельностью матриксных металлопротеиназ. Сами по себе сфероиды клеток рака молочной железы в значительной степени способны инфильтрировать в среде фибриллярного коллагена I типа, однако они теряли какую-либо выраженную способность к инфильтрации в субстрате экстракта мышинового внеклеточного матрикса (Matrigel1). Внесение макрофагов как в составе раковых сфероидов, так и непосредственно в сам субстрат мышинового внеклеточного матрикса значительно улучшило инфильтративную способность сфероидов клеток рака молочной железы, но не увеличило инвазивность в среде фибриллярного коллагена [33].

Макрофаги M2-типа способствуют инвазивности трёхмерных сфероидных моделей клеток рака молочной железы в экстракте базальной мембраны Gultrex1 посредством паракринной передачи сигналов, а также при помощи прямых межклеточных взаимодействий во время совместного культивирования в субстрате коллагена I типа [11, 14]. Фибробласты, входящие в состав ракового микроокружения, и, собственно, сами раковые клетки, способствуют M2-дифференциации макрофагов посредством секреции таких факторов, как интерлейкин-6 (IL-6) и стромальный фактор роста-1 (SDF-1) [22].

Исследования трёхмерных сфероидных моделей клеточных культур с использованием альгинатной пористой платформы AlginateMatrix™ показали, что культивирование клеток рака молочной железы мыши только с фибробластами оказало негативное влияние на образование раковых сфероидов, тогда как совместное культивирование только с макрофагами вообще ингибировало их рост. В свою очередь, только совместное культивирование макрофагов, фибробластов и раковых клеток приводило к увеличению количества сфероидов [31]. Добавление макрофагов к субстрату коллагена крысиного хвоста, включающего слой дермальных мышинных фибробластов, поверх которых культивировали клетки плоскоклеточной мышинной карциномы, приводило к поляризации макрофагов в M2-подобный фенотип с последующей активной инвазией клеток карциномы в коллагеновый субстрат за счет увеличения коллагенолитической активности металлопротеи-

наз (MMP2 и MMP9). Исследователи подтвердили полученный результат посредством анализа совместного культивирования клеток плоскоклеточного рака кожи человека, первичных дермальных фибробластов человека и макрофагов, полученных из моноцитов человека [20].

Эти результаты указывают на значительное влияние состава трёхмерной матрицы на взаимодействие между иммунными и раковыми клетками. Кроме того, вышеуказанное подтверждает значительное влияние иммунных клеток при взаимодействии раковых клеток и их микроокружения.

Значение различных типов опухолевых клеток и их отдельных клеточных линий для прогностической способности трёхмерных опухолевых моделей. Опухолевые сфероиды, включающие различные типы раковых клеток, также демонстрируют различия секреторного профиля. В соответствии с этим интенсивность инфильтрации моноцитов и характер их поляризации может различаться в зависимости от типа опухолевой клеточной линии. В частности, недавнее исследование показало наибольшую инфильтративную активность моноцитов для сфероидов, созданных с использованием клеточных линий рака поджелудочной железы MIA и PaCa-2 (рак поджелудочной железы), а наименьшую инфильтративную активность продемонстрировали моноциты в сфероидных моделях рака молочной железы MCF-7 [24]. Более того, указанные результаты согласуются с данными других исследований [17, 25]. Также было выявлено, что фибробласты 1BR.3.G улучшают стабильность сфероидов и повышают общую физиологическую значимость моделей. При совместном культивировании фибробластов 1BR.3.G и раковых клеток MIA PaCa-2 наблюдалось образование более мелких и компактных сфероидов. Впрочем, степень их стабильности зачастую оставалась низкой [24], что, по-видимому, является общей проблемой для этой линии раковых клеток [6, 25], указывая на отсутствие связи активной инфильтрации и поляризации моноцитов с клеточной линией фибробластов.

Нельзя не отметить результаты анализа влияния ингибиторов и антител CSF1R, вносимых одновременно с моноцитами в аналогичные трёхмерные модели клеточных линий MCF-7, HT-29 (рак толстой кишки), PANC-1 (рак поджелудочной железы), MIA PaCa-2, так как и в данном случае был показан неоднородный характер сни-

жения инфильтративной способности моноцитов между рассматриваемыми моделями в ответ на воздействие антител и ингибиторов CSF1R. Видимое снижение инфильтративной способности моноцитов было показано для моделей, включающих клеточные линии MCF-7 и MIA PaCa-2, в то время как сфероиды клеточных линий HT-29 и PANC-1 демонстрируют незначительное снижение инфильтративной способности [18].

В результате поляризации моноцитарных предшественников, зависящей от типа раковых клеток, исследователи наблюдают различные фенотипические проявления опухоли-ассоциированных макрофагов, что четко фиксируется в результате анализа трёхмерных моделей. В частности, сфероиды MIA PaCa-2 поляризуют инфильтрирующие моноциты в M2-подобные макрофаги, тогда как макрофаги, полученные из костного мозга, поляризованные сфероидными моделями MCF-7, проявляют M1-подобный фенотип. Среди других моделей, формируемых с использованием клеточных линий HT-29 и PANC-1, наблюдают смешанный тип поляризации с преобладанием макрофагов M2-подобного фенотипа и экспрессией маркеров M1-подобного фенотипа. Стоит отметить заметные отличия между макрофагами, детерминированными опухолевым микроокружением, и макрофагами, полученными из костного мозга и поляризованными совместным культивированием с опухолевыми сфероидными моделями. Представленные результаты указывают на специфическую роль клеточных взаимодействий между раковыми клетками и моноцитами [24], а также хорошо соотносятся с данными о более выраженном развитии фенотипа, ассоциированного с развитием опухоли, для макрофагов, встроенных непосредственно в опухолевые сфероиды, по сравнению с макрофагами, которые диффузно рассеяны по всему коллагеновому субстрату [7].

Анализ профиля секреции рассматриваемых моделей опухолевых клеток показал заметные различия уже до совместного культивирования с моноцитами, подтверждая способность раковых клеток влиять на инфильтрирующие моноциты в зависимости от их индивидуального профиля секреции. Как правило, сфероиды MCF-7 проявляли общий низкий уровень секреции растворимых факторов. Вместе с тем, микроокружение сфероидов MIA PaCa-2 демонстрировало четкий провоспалительный профиль в сочетании

с высокой секрецией противовоспалительного цитокина IL-10 и проангиогенных факторов. Впрочем, секреция большинства растворимых факторов существенно увеличивалась при добавлении моноцитов к культурам сфероидов. Общим для всех моделей является увеличение уровней CCL2, CCL22, CCL24 и IL-10. CCL2, CCL22 и CCL24 связаны с M2-подобной поляризацией и достоверно ассоциированы с плохим прогнозом у онкобольных. Параллельно с этим наблюдалось снижение секреции IL-12 – ключевого фактора противоопухолевого иммунного ответа. Для моделей, включающих клеточные линии HT-29, PANC-1 и MIA PaCa-2, показан высокий уровень секреции VEGF, который, помимо преобразования иммунного микроокружения в иммуносупрессивное состояние, связан с экспрессией факторов CCL2 и IL-4 необходимых для рекрутирования моноцитов [24]. Вместе с тем моноциты, инфильтрирующие сфероиды HT-29, могут также обладать противоопухолевой активностью, поскольку характерная для них секреция CXCL10 и CXCL11 была связана с подавлением опухолевой активности [13, 24].

Гистологический анализ моделей показал следующие структурные особенности: фибробласты в трехмерной модели клеточной линии HT-29 структурно связаны с некротическим ядром, для сфероидов клеточной линии MCF-7 показано прямое взаимодействие с клетками MCF-7 с последующим формированием дифференцированных структур.

Аналогичные результаты были выявлены уже при использовании различных клеточных линий рака молочной железы: самая высокая интенсивность моноцитарной инфильтрации была показана для трехмерных сфероидных моделей клеточной линии Hs578T (ER-отрицательная карцинома); сфероидные модели клеточной линии T47D показали умеренную степень инфильтрации моноцитов; наименьшая степень моноцитарной инфильтрации показана для сфероидных моделей клеточных линий BT549 (протоковая карцинома), BT474 (протоковая карцинома) и MCF7 (ER-положительная аденокарцинома) [17], что указывает на способность трехмерных моделей клеточных культур достоверно воспроизводить процессы опухолевого развития вплоть до различий на молекулярном уровне. На основе анализа сфероидных моделей двух разных клеточных линий рака молочной железы (MCF-7 и MDA-MB-231), обладающих различ-

ной агрессивностью, были показаны принципиально различные эффекты взаимодействия между моноцитами и раковыми клетками. С одной стороны, для сфероидных моделей менее агрессивной клеточной линии MCF-7 присутствие моноцитов снижало экспрессию таких маркеров злокачественности опухоли, как металлопротеиназа 9, урокиназный активатор плазминогена, циклооксигеназа-2, остеопонтин. С другой стороны, совместное культивирование моноцитов с трехмерными сфероидными моделями агрессивной клеточной линии MDA-MB-231 увеличивало экспрессию генов матриксных металлопротеиназ, в результате чего раковые клетки и моноциты демонстрировали большую совместную инфильтративную способность в субстрате экстракта мышинового внеклеточного матрикса (Matrigel1) [22].

Схожие результаты были показаны и для дендритных клеток, полученных из клеток периферической крови посредством воздействия IL-4 и гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF), при совместном культивировании со сфероидными моделями различных опухолевых клеточных линий. В зависимости от опухолевой клеточной линии различался характер модуляции дендритных клеток [18].

Существуют исследования, которые демонстрируют взаимосвязь между моноцитарной и нейтрофильной инфильтрацией. Так, при инфильтрации сфероидов CD14⁺ моноцитами происходит последующее снижение нейтрофильной инфильтрации. Напротив, предшествующая инфильтрация нейтрофилами не влияла на последующую инфильтрацию моноцитов, а опухоли с истощением макрофагов у мышей показали более высокую инфильтрацию нейтрофилами [28].

Таким образом, трехмерные клеточные модели являются целесообразным средством для изучения инфильтративной способности моноцитов и поляризации опухолеассоциированных макрофагов вплоть до особенностей различных типов опухолей и их отдельных клеточных линий, что позволяет использовать её в качестве восприимчивого инструмента скрининга противораковых соединений *in vitro*.

Разнообразие структурных групп трехмерных опухолевых моделей. С целью создания опухолевых моделей немелкоклеточного рака легких (HMPЛ) *in vitro*, включающих миелоидный компартмент, Sofia P. Rebelo и др. подготовили трехмерные модели

клеточных культур, заключенные в альгинатные микрокапсулы со средним диаметром 652 ± 26 мкм. Данная трехмерная модель включала три клеточных компартмента: сфероиды клеток HMPЛ (клеточная линия NCI-H157), ассоциированные с раком фибробласты (CAF) и моноцитарную клеточную линию THP-1. Микрокапсулированные модели содержали в суспензионной культуре при постоянном перемешивании в течение трёх недель. Каждый тип клеток демонстрировал высокую жизнеспособность в течение всего времени культивирования. Пролиферация клеток была равномерной во всех компартментах и приводила к десятикратному увеличению концентрации опухолевых клеток к третьей неделе, что было сопоставимо с ростом в опухолевых монокультурах и контрольных группах с двойным совместным культивированием (клетки HMPЛ культивировали либо с опухоль-ассоциированными фибробластами, либо с моноцитарной клеточной линией THP-1). Эти результаты свидетельствуют о том, что совместное культивирование стромальных и моноцитарных клеток не оказывало значимого влияния на опухолевую пролиферацию [2].

В течение периода культивирования модели, состоящие из трёх указанных компонентов, содержали многочисленные сфероиды и клеточные кластеры, включающие все типы клеток (клетки HMPЛ, CAF и THP-1). Напротив, в микрокапсулах опухолевых монокультур обнаруживались от одного до трёх крупных сфероидов, имеющих рыхлую форму и состоящих из клеток положительных по N-кадгерину и виментину (NCI-H157 сохраняют свой типичный мезенхимальный фенотип при микроинкапсуляции). Более того, в наблюдаемых многокомпонентных моделях происходило интенсивное накопление белков внеклеточного матрикса: фибронектина, коллагенов первого и четвертого типов, что вкупе с множественными клеточными кластерами и одиночными клетками, формировало тканеподобную модель. На периферии альгинатных микрокапсул наблюдалось интенсивное накопление белков внеклеточного матрикса, в которых располагались клетки, демонстрирующие мигрирующий фенотип, что свидетельствует об активном перемещении клеток внутри микрокапсул и формировании более инвазивного фенотипа [2].

Одиночные CD45⁺ положительные клетки и их небольшие скопления обнаруживались вокруг более крупных

опухолевых сфероидов как в трехмерных моделях с тремя компартментами, так и в иммуноцит-опухолевых моделях. Подобное распределение CD45+ клеток в рассматриваемых моделях свидетельствует об усиливающейся активности микроокружения опухоли в отношении инфильтрации миелоидных клеток в опухолевые сфероиды. Аналогичное распределение показано для CD68. Высокая экспрессия CD68 свидетельствует об активной дифференцировке моноцитов в макрофаги. Более того, в моделях с тремя компартментами и парных контрольных моделях (THP-1/CAF и THP-1/HMPJL) фиксировалось высокое содержание CD163+ клеток, в то время как в моноцитарных монокультурах CD163+ клетки фиксировались на остаточном уровне. Это свидетельствует о способности стимулировать дифференцировку моноцитарных клеток в направлении M2-подобного фенотипа как для опухолевых клеток, так и для CAF. Соотношение CD163+/CD68+ клеток, характеризующее долю M2-подобных макрофагов, для трехмерной модели с тремя компартментами и контрольной модели «THP-1/HMPJL» составляет примерно 15–20% и всего 2% в культуре «CAF/THP1». Высокая степень поляризации была подтверждена с использованием трехмерных моделей с моноцитами периферической крови (PBM) донорского происхождения. В среднем через 4 дня культивирования в полных моделях 70–80% CD45+ клеток экспрессировали M2-подобные маркеры (CD206 и CD163), в то время как в монокультуре микроинкапсулированных PBM только 2–6%.

Высокая доля клеток CD163+ клеток показывает, что представленная модель (трехмерная сфероидная структура из трех компартментов, инкапсулированная в альгинатную оболочку) способствует клеточной миграции, схожей с миелоидной инфильтрацией при раке легкого человека в физиологических условиях. На значительно более низком уровне CD163+ клетки наблюдались в контрольных культурах с «THP-1/HMPJL» и «THP-1/CAF». Это согласуется с предыдущими сообщениями о высокой активности CAF в контексте привлечения моноцитов, ассоциированных с выраженным изменением секреторного профиля и высокой продукцией белков внеклеточного матрикса. Более того, в моделях совместного культивирования моноцитов крови со сфероидными клетками рака молочной железы и сфероидными опухоль-ассоциированными фибробластами

(CAF) миграция моноцитов была выше в направлении сфероидов CAF, для которых показана сверхэкспрессия *CCL2* [17]. Высокое значение CAF подтверждается в исследованиях с использованием классических моделей рака. В пределах опухолевого микроокружения CAF способствуют рекрутированию моноцитов и их дифференциации в иммуносупрессивные макрофаги M2 посредством синтеза интерлейкина-6 (IL-6) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [10], а также в миелоидные супрессорные клетки (MDSC) через сигнал преобразования и активации транскрипции 3 (STAT3) [26].

Важной особенностью показанной трехмерной модели является использование инертного каркаса, поскольку введение физиологически релевантных белков внеклеточного матрикса остается фундаментальной проблемой для анализа опухолей *in vitro* [30]. Рассматриваемые альгинатные микрокапсулы позволяют накапливать коллаген I и IV типов и фибронектин, образуя коллагеновые волокна с единичными клеточными включениями, что способствует формированию тканеподобных структур [29].

Использование классических трехмерных моделей позволяет получать относительно достоверные результаты в контексте анализа опухолевого микроокружения. Однако сами по себе указанные модели обладают низкой прогностической силой в отношении динамических параметров опухолей *in vivo*. Указанная проблема получила решение посредством комбинации стандартных трехмерных моделей и контролируемых динамических сред. Интересной иллюстрацией данного подхода является трехмерная многокомпонентная клеточная модель (клетки рака молочной железы, CAF, эндотелиальные клетки), культивируемая на микрожидкостном чипе. Архитектура указанной модели предполагает поток среды из периферических камер, заселенных клетками рака молочной железы и PBMC, через центральную камеру, занятую CAF. Анализ представленной модели подтверждает способность CAF модулировать иммунные клетки, сокращая время их контакта с опухолевыми клетками [8].

Микрожидкостные системы представляют собой трехмерные модели с высокой пропускной способностью и возможностью автоматизированной обработки нескольких проб, позволяя создавать миметические среды в соответствии со свойствами исследуемого

органа и ткани [27]. Анализ с применением трехмерных микрожидкостных моделей показал высокое значение фактора регуляции интерферона (IRF-8) для способности иммунных клеток ограничивать инвазивность раковых клеток, что подтверждается результатами исследований *in vivo* [4, 9]. Любопытный результат был показан с использованием трехмерных микрожидкостных систем для воспроизведения и анализа взаимодействия раковых клеток и сосудистой сети опухоли в присутствии иммуноцитов. Два канала, заселенные клетками карциномы молочной железы человека (MDA231) и эндотелиальными клетками (HUVEC), были соединены трехмерной гидрогелевой структурой на основе внеклеточного матрикса, в результате чего эндотелиальные клетки образовали слой на поверхности внеклеточного матрикса, а опухолевые клетки активно инфильтрировали его. В результате заселения опухолевого канала мышинными макрофагами (RAW264.7) наблюдалась значительно более высокая скорость интраваскуляции в эндотелиальный слой [34].

В следующем исследовании используется трехмерная модель, представляющая из себя микрожидкостную систему каналов, заполненных средой и коллагеновым субстратом, которые включают клетки гепатоцеллюлярной карциномы. Работа с данной моделью предполагает миграцию иммунных клеток, маркированных флуоресцентным красителем, из периферических каналов, заполненных средой, в центральный канал, заполненный коллагеновым субстратом и клетками гепатоцеллюлярной карциномы. Кроме того, включение так называемых мертвого и живого дискриминационных красителей в состав субстрата позволяет детектировать динамику гибели клеток [3]. Указанная трехмерная модель опухоли была адаптирована посредством увеличения клеточного разнообразия микрожидкостной системы путем включения первичных моноцитов человека. Моноциты суспендировали вместе с агрегатами клеток-мишеней в коллагеновом геле, вводили в центральную область гидрогеля микрожидкостного устройства и культивировали в течение ночи. Конечное расположение клеток в микрофлюидной платформе имитирует некоторые особенности опухолевого микроокружения *in vivo*, что позволяет анализировать многочисленные межклеточные взаимодействия [12]. Помимо увеличения клеточного разнообразия как качественного изменения

трехмерных моделей некоторые исследователи предполагают важность пропорционального соотношения различных клеточных групп, так как это может способствовать миметичности разрабатываемых моделей [8].

К обособленной группе трехмерных моделей, близких по своим свойствам к классическим сфероидным моделям, относятся так называемые органоиды, представляющие из себя миниатюрные модели органов, встроенные во внеклеточный матрикс и сформированные из стволовых и слабодифференцированных клеток, полученных путем механического или ферментативного расщепления первичной донорской ткани. Органоиды воспроизводят архитектуру, а также разнообразие клеточных компартментов и организацию исходной ткани, что позволяет в значительной степени воспроизводить физиологические условия. Органоиды, полученные от пациентов, позволяют получить трехмерную культуру раковых клеток, выделенных из первичных обработанных тканей, что может приводить к потере стромальных и иммунных компартментов. После формирования исследовательской модели органоидов, полученных от пациентов, в качестве ко-культуры могут быть внесены моноклеарные клетки периферической крови или другие группы иммунных и стромальных клеток [8].

Заключение. Из данных, представленных выше, формируется четкое представление о важности дальнейшей оптимизации трехмерных опухолевых моделей с целью получения оптимальных средств воспроизведения всего разнообразия структур и условий опухолевой стромы. Оценка терапевтических соединений в классических 2D-моделях может позволить относительно достоверно изучать разнообразные эффекты противоопухолевых агентов на иммунные клетки вне контекста опухолевого микроокружения. Однако влияние противоопухолевых агентов на инфильтрацию и модуляцию иммунных клеток в комплексе с опухолевым микроокружением не может быть изучено должным образом посредством классических двумерных моделей. Вероятно, это и объясняет относительно низкий уровень успеха противораковой иммунотерапии, прошедшей доклинические испытания на 2D-моделях [1, 2]. Опухолевые трехмерные клеточные модели представляются оптимальным средством для изучения инфильтративной способности моноцитов и последующей по-

ляризации опухоль-ассоциированных макрофагов. Необходимо отметить высокий уровень чувствительности трехмерных моделей, позволяющий фиксировать сложный комплекс изменений в соответствии с разными клеточными популяциями и клеточными линиями, что позволяет использовать её в качестве восприимчивого инструмента скрининга противораковых соединений *in vitro*.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-25-0053, <https://rscf.ru/project/22-25-00531/>.

Литература

- 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained / Zanoni M, et al. *Sci Rep*. 2016;6:19103. Published 2016 Jan 11. Doi:10.1038/srep19103.
- 3D-3-culture: A tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment / Rebelo SP, et al. *Biomaterials*. 2018;163:185-197. Doi:10.1016/j.biomaterials.2018.02.030.
- A 3D microfluidic model for preclinical evaluation of TCR-engineered T cells against solid tumors / Pavesi A, et al. *JCI Insight*. 2017;2(12):e89762. Published 2017 Jun 15. Doi:10.1172/jci.insight.89762.
- A multidisciplinary study using *in vivo* tumor models and microfluidic cell-on-chip approach to explore the cross-talk between cancer and immune cells / Mattei F, et al. *J Immunotoxicol*. 2014;11(4):337-346. Doi:10.3109/1547691X.2014.891677.
- A novel mechanism for anti-EGFR antibody action involves chemokine-mediated leukocyte infiltration / Hoffmann TK, et al. *Int J Cancer*. 2009;124(11):2589-2596. Doi:10.1002/ijc.24269.
- A synergic approach to enhance long-term culture and manipulation of MiaPaCa-2 pancreatic cancer spheroids / Cavo M, et al. *Sci Rep*. 2020;10(1):10192. Published 2020 Jun 23. Doi:10.1038/s41598-020-66908-8.
- Akins EA, Aghi MK, Kumar S. Incorporating Tumor-Associated Macrophages into Engineered Models of Glioma // *iScience*. 2020;23(12):101770. Published 2020 Nov 5. Doi:10.1016/j.isci.2020.101770.
- Boucherit N, Gorvel L, Olive D. 3D Tumor Models and Their Use for the Testing of Immunotherapies // *Front Immunol*. 2020;11:603640. Published 2020 Dec 10. Doi:10.3389/fimmu.2020.603640.
- Cancer-driven dynamics of immune cells in a microfluidic environment / Agliari E, et al. *Sci Rep*. 2014;4:6639. Published 2014 Oct 16. Doi:10.1038/srep06639.
- Cancer-Stimulated CAFs Enhance Monocyte Differentiation and Protumoral TAM Activation via IL6 and GM-CSF Secretion / Cho H, et al. *Clin Cancer Res*. 2018;24(21):5407-5421. Doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0125.
- Cell type-dependent pathogenic functions of overexpressed human cathepsin B in murine breast cancer progression / Bengsch F, et al. *Oncogene*. 2014;33(36):4474-4484. Doi:10.1038/onc.2013.395.
- Characterizing the Role of Monocytes in T Cell Cancer Immunotherapy Using a 3D Microfluidic Model / Lee SWL, et al. *Front Immunol*. 2018;9:416. Published 2018 Mar 6. [published correction appears in *Front Immunol*. 2018 Jul 24;9:1719]. Doi:10.3389/fimmu.2018.00416.
- CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy / Tokunaga R, et al. *Cancer Treat Rev*. 2018;63:40-47. Doi:10.1016/j.ctrv.2017.11.007.
- Cytokines secreted by macrophages isolated from tumor microenvironment of inflammatory breast cancer patients possess chemotactic properties / Mohamed MM, et al. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;46:138-147. Doi:10.1016/j.biocel.2013.11.015.
- Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium / Chaudhuri O, et al. *Nat Mater*. 2014;13(10):970-978. Doi:10.1038/nmat4009.
- Groebe K, Mueller-Klieser W. Distributions of oxygen, nutrient, and metabolic waste concentrations in multicellular spheroids and their dependence on spheroid parameters // *Eur Biophys J*. 1991;19(4):169-181. Doi:10.1007/BF00196343.
- Importance of CCL2-CCR2A/2B signaling for monocyte migration into spheroids of breast cancer-derived fibroblasts / Ksiazkiewicz M, et al. *Immunobiology*. 2010;215(9-10):737-747. Doi:10.1016/j.imbio.2010.05.019.
- In vitro* 2D and 3D cancer models to evaluate compounds that modulate macrophage polarization / Helleberg Madsen N, et al. *Cell Immunol*. 2022;378:104574. Doi:10.1016/j.celimm.2022.104574.
- Influence of the stiffness of three-dimensional alginate/collagen-I interpenetrating networks on fibroblast biology / Branco da Cunha C, et al. *Biomaterials*. 2014;35(32):8927-8936. Doi:10.1016/j.biomaterials.2014.06.047.
- Integrating macrophages into organotypic co-cultures: a 3D *in vitro* model to study tumor-associated macrophages / Linde N, et al. *PLoS One*. 2012;7(7):e40058. Doi:10.1371/journal.pone.0040058.
- Kim H, Phung Y, Ho M. Changes in global gene expression associated with 3D structure of tumors: an *ex vivo* matrix-free mesothelioma spheroid model // *PLoS One*. 2012;7(6):e39556. Doi:10.1371/journal.pone.0039556.
- MMP1, MMP9, and COX2 expressions in promonocytes are induced by breast cancer cells and correlate with collagen degradation, transformation-like morphological changes in MCF-10A acini, and tumor aggressiveness / Chimal-Ramírez GK, et al. *Biomed Res Int*. 2013;2013:279505. Doi:10.1155/2013/279505.
- Modeling human tumor angiogenesis in a three-dimensional culture system / Seano G, et al. *Blood*. 2013;121(21):e129-e137. Doi:10.1182/blood-2012-08-452292.
- Monocyte Infiltration and Differentiation in 3D Multicellular Spheroid Cancer Models / Madsen NH, et al. *Pathogens*. 2021;10(8):969. Published 2021 Jul 30. Doi:10.3390/pathogens10080969.
- Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model / Kuen J, et al. *PLoS One*. 2017;12(7):e0182039. Published 2017 Jul 27. Doi:10.1371/journal.pone.0182039.
- Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner / Mace TA, et al. *Cancer Res*. 2013;73(10):3007-3018. Doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4601.
- Photothermal treatment of glioma: an *in vitro* study of macrophage-mediated delivery of gold nanoshells / Baek SK, et al. *J Neurooncol*. 2011;104(2):439-448. Doi:10.1007/s11060-010-0511-3.