

ОПУХОЛЕВЫЕ ОРГАНОИДЫ: ЭРА ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

©2024 г. Н. В. БУЛАТЕНКО¹, А. Ю. РЯЗАНОВА¹,
А. Р. ЛИХОВ¹, С. А. БРУСКИН^{1,2},
Л. Г. МАЛОШЕНОК^{1,2}, В. В. ЖЕРДЕВА^{1*}

¹Институт биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН,
Москва

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

I. Введение. II. Модели для изучения механизмов канцерогенеза и скрининга противоопухолевых препаратов. От *in vitro* к *in vivo*. III. Опухолевые органоиды для изучения механизмов противоопухолевого ответа и использования в прецизионной терапии. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Ранее разработку противоопухолевых препаратов осуществляли исходя из того, что опухоли с идентичной гистопатологией имеют одинаковый лекарственный отклик. В результате назначение терапии определяется регламентами стандартизованных протоколов. Такая концепция не учитывает индивидуальные характеристики опухоли, часто результатом становится упущенное время и ухудшение состояния пациентов вплоть до летального исхода, поскольку лишь в ряде

Принятые сокращения: 2D – двумерный; 3D – трехмерный, пространственный; CSC – cancer stem cells (опухолевые стволовые клетки); CTC – circulating cancer cells (циркулирующие опухолевые клетки); AdSC – adult stem cells (постнатальные стволовые клетки); CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными спейсерами); CTLA-4 – cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (антиген 4-го типа, ассоциированный с цитотоксическим Т-лимфоцитом); ECM – extracellular matrix (внеклеточный матрикс); ESC – embryonic stem cells (эмбриональные стволовые клетки); iPSC – induced pluripotent stem cells (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки); PDO – patient-derived organoids (органоиды, полученные из тканей пациента); PDT0 – patient-derived tumor organoids (органоиды, полученные из опухолевой ткани пациента); PDX – patient-derived xenograft (ксенотрансплантат, полученный из клеток пациента).

*Адрес для корреспонденции: vjerdeva@inbi.ras.ru

Работа А.Ю.Рязановой, Л.Г.Малошенок, С.А.Брускина по исследованию технологий на основе CRISPR/Cas9 выполнена при поддержке Российского научного фонда, соглашение № 221400205, <https://rscf.ru/project/22-14-00205/>

случаев пациенты реагируют на лечение [1]. При этом известно, что более 95% противоопухолевых препаратов, которые эффективны в доклинических исследованиях, впоследствии терпят неудачу в клинических испытаниях [2]. Таким образом, переход от доклинических моделей к клиническим исследованиям можно рассматривать как узкое место онкологии, а подбор правильной доклинической модели – это задача, важность которой невозможно переоценить.

В эру персонализированной медицины традиционные подходы, связанные с тестированием лекарственных противоопухолевых средств на культурах клеток и на модельных животных, не всегда могут отразить «индивидуальность» злокачественного новообразования при анализе отклика на терапию [3], учесть роль опухолевого микроокружения [4–6]. Таким образом, важнейшей задачей является подбор опухолевой модели для персонализированного лечения, прогнозирования индивидуальной чувствительности к лекарствам и для оценки чувствительности к химиотерапии с целью дальнейшей оптимизации персонализированного скрининга [7].

С 2009 года возник интерес к опухолевым органоидам. Они представляют собой самоорганизующиеся трехмерные гетерогенные совокупности клеток, полученных из стволовых, плюрипотентных, эмбриональных либо постнатальных стволовых клеток, которые были выделены из образцов пациентов и которые имитируют ключевые гистопатологические, генетические и фенотипические характеристики исходной опухоли [3]. Подобные трехмерные опухолевые модели являются перспективными инструментами для оценки индивидуальной чувствительности к лекарствам, для оценки динамического профиля чувствительности к химиотерапии, таргетной терапии, а также реализации прецизионной иммунотерапии злокачественных образований.

В данном обзоре мы решили проанализировать эволюцию опухолевых моделей за последние 15–20 лет от клеточных культур до трехмерных тканеспецифических опухолевых органоидов, продемонстрировать их значение в выявлении механизмов противоопухолевого ответа, в том числе с участием клеток иммунной системы и микроокружения, резистентности, использование данных моделей в лекарственном скрининге и в разработке прецизионных методов лечения опухолевых заболеваний. В этом обзоре мы также обсудим различные стратегии культивирования органоидов для моделирования иммунного микроокружения опухоли, их применение и преимущества в тестировании иммунотерапевтических подходов, разработке новых подходов к персонализированной медицине, преодолении лекарственной устойчивости.

**II. МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ
КАНЦЕРОГЕНЕЗА И СКРИНИНГА
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ.
ОТ *IN VITRO* К *IN VIVO***

ДВУМЕРНЫЕ ЛИНИИ КЛЕТОК

Иммортализованные двумерные (2D) линии опухолевых клеток традиционно используются в тестировании кандидатов в лекарственные средства, предназначенных для лечения злокачественных новообразований. Они просты и дешевы в культивировании, а потому удобны для широкомасштабного скрининга противоопухолевых лекарственных препаратов (Таблица 1).

В 1990-ые годы в Национальном институте онкологии США (NCI) ежегодно около 10 000 соединений проходили через тестирования на панелях из 60 линий опухолевых клеток человека [8]. Уже тогда при анализе ингибирования роста клеток при тестировании 60 000 соединений были обнаружены корреляции между активностью лекарства и генотипом и фенотипом клеток [8].

**Таблица 1. Опухолевые модели,
используемые в доклинических исследованиях**

Параметры модели для использования в доклинических исследованиях	Двумерные	Трехмерные		
	Линия клеток	Сфероиды	Органоиды	Ксенотрансплантаты
	Источник			
	Иммортализованная клеточная линия	Клетки пациента (ESC, iPSC, AdSC), клетки опухоли*		
Сложность создания и работы	Оптимальная	Приемлемая	Приемлемая	Высокая
Цена	Низкая	Средняя	Высокая	Очень высокая
Длительность эксперимента	Дни	Дни, месяцы	Дни, месяцы	Месяцы
Пригодность для скрининга лекарств	Высокая	Высокая	Высокая	Низкая
Пригодность для подбора иммунотерапии	Нет	Нет	Высокая	Низкая

* ESC – эмбриональные стволовые клетки, iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые, AdSC – постнатальные («взрослые») стволовые клетки.

Однако генетическая и хромосомная нестабильность опухолевых клеточных линий, и, как следствие, изменение фенотипа могут поставить под угрозу точность и воспроизводимость экспериментов на клетках. Известно, что при длительном культивировании при каждом пассаже накапливаются генетические изменения и проявляется хромосомная нестабильность, таким образом, увеличивая отличие лабораторной модели от исходной опухоли [9]. В качестве примеров хромосомной нестабильности можно привести ошибки сегрегации хромосом во время митоза с образованием нестабильных микроядер и цепочкой событий, инициирующих воспалительный ответ. Хроническая активация пути ключевых медиаторов воспаления и клеточного стресса cGAS–STING (циклической GMP–AMP синтазы (cGAS)-стимулятора генов интерферона (STING)) усиливает инвазию и метастазирование опухолевых клеток через STING и через неканонический путь транскрипционного фактора NF-κB [10]. Еще одним последствием хромосомной нестабильности является образование кластеров внехромосомной ДНК (кольцевых фрагментов ДНК, которые могут содержать онкогены, амплификация которых может привести к их сверхэкспрессии) [11].

Известны примеры мутаций рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) у пациентов, страдающих распространенным немелкоклеточным раком легкого. Таргетными препаратами 1-й линии для данного вида рака являются ингибиторы тирозинкиназы [12]. Для определения специфичности ингибиторов тирозинкиназы EGFR в отношении клинически значимых мутантов подбирают или получают клеточные линии, аберрантные по данному белку [13]. Таким образом, скрининг препаратов на двумерных культурах стремятся проводить с учетом молекулярного профиля терапевтических мишеней [14].

Потенциал двумерных клеточных линий на сегодняшний день используется максимально. Различные линии опухолевых клеток собраны в коллекциях Национального института онкологии (США) и Центра терапевтической онкологии имени Хэймона (США), а также представлены в таких коллекциях типовых культур, как ATCC (США), CellBank (Австралия), Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур (Великобритания), Японская коллекция исследовательских банков клеточных биоресурсов, Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур, банк клеток Riken BioResource Center (Япония). В настоящее время на основе культур опухолевых клеточных линий сформированы целые фармакогенетические платформы: энциклопедия раковых клеточных линий (CCLE) [15], геномика лекарственной чувствительности при раке (GDSC) [16–18], пор-

тал реакции рака на терапию (CTRP) [19], инициатива по скринингу клеточных линий Genentech (gCSI) [20, 21], «Connection map» (CMap) [22, 23]. CMap представляет результаты профилей экспрессии генов до и после лечения на уровне транскриптов. Изучены десятки тысяч низкомолекулярных препаратов, коротких образующих шпильки РНК (shRNA), кДНК, а также сотни биологических препаратов.

Также двумерные клеточные линии используют для получения простых моделей на животных, тем самым имитируя рост опухоли *in vivo*. В 95% это исследования на мелких лабораторных животных (крысах и мышах) на подкожных ксенотрансплантатах из аутологичных или гетерологичных опухолевых клеток [24–29].

Но человеческие опухоли могут быть получены только на иммунодефицитных мышах. Модель, при которой мышам вводят клетки, полученные из двумерной культуры человеческих опухолевых клеток, называется CDX (cell line-derived xenograft) [30]. Выбор определенной экспериментальной модели диктуется в первую очередь теми задачами, которые поставлены в рамках планируемого исследования [31]. Выбор экспериментальной опухолевой модели можно проводить в соответствии с развернутой оценкой панелей клеточных линий *in vitro*, ориентируясь на «Каталог соматических мутаций при раке» (COSMIC, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), секвенирование образцов опухолей и анализ наборов клинических данных.

Гетерологичные человеческие опухолевые клетки прививают как подкожно (гетеротопическая локализация опухоли), так и в естественное морфологическое окружение, соответствующее исходной топографии опухоли (ортотопическая локализация опухоли). При этом показано, что подкожные инокуляции опухолевых клеток бестимусным мышам некорректно отражают взаимодействие между опухолевыми клетками, локальной стромой и микроокружением опухоли, а гетеротопическая локализация первичного опухолевого узла изменяет картину опухолеобразования [26]. Ортопическая модель значительно лучше имитирует естественный рост опухоли за счет нахождения опухоли в правильном микроокружении [32].

Тем не менее, мышинные модели на основе двумерных опухолевых клеточных линий весьма активно задействованы для решения научных задач в области молекулярной медицины с использованием инструментов молекулярной флуоресцентной визуализации, например программируемой клеточной гибели на основе генетически кодируемых сенсоров [33], метаболического профилирования опухолей [34–36], а также для разработки сочетанных методов визуализации на животных моделях [37–40]. Данные модели используются для подбора

условий, режимов и реализации фотодинамической и фототермической терапии [41], разработки фотоиммунотерапевтических методов лечения рака [42], методов противоопухолевой и детоксицирующей терапии [43] – и это неполный список приложений на основе данных моделей. Тем не менее, существует потребность в релевантных животных моделях и, конечно же, в хорошо охарактеризованных конечных точках оценки эффективности скрининга доклинических моделей для того, чтобы однозначно интерпретировать ряд расхождений в результатах доклинических и клинических исследований [31, 44].

СФЕРОИДЫ

Наиболее простой микромоделью опухоли является сфероид, который воспроизводит трехмерную структуру опухолевой ткани с точки зрения морфологии (Таблица 1). Четкого и универсального определения, что такое сфероиды, в мировой литературе нет. В узком смысле под сфероидами подразумевают плотные клеточные агрегаты сферической формы, которые не распадаются при попытке поднять их и переместить [45]. Впервые сфероиды были получены в 1970 году [46]. Клетки сфероидов имеют сходство с клетками злокачественных новообразований как с точки зрения морфологии (физической формы и структуры), так и с точки зрения профиля продуцируемых веществ и состава рецепторов [16].

Кинетика роста сфероидов *in vitro* сходна с кинетикой роста солидных опухолей. В начальной фазе роста опухоли происходит активное деление опухолевых клеток, что обусловлено подходящими условиями для их роста и деления. По достижении опухолю определенного размера, когда доступ кислорода и питательных веществ к внутренним клеткам опухоли становится ограничен из-за отсутствия сосудистой сети, возникает замедление роста и переход в фазу покоя. Опухоль выходит из состояния покоя благодаря ангиогенезу, вызванному такими факторами, как ангиогенин и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [47]. Однако даже в этом случае внутри опухоли не исчезает зона гипоксии, поскольку васкуляризация носит хаотический характер [48]. В условиях гипоксии клетки получают энергию путем гликолиза, что приводит к образованию большого количества лактата и закислению среды.

Внутри крупных сфероидов, аналогично солидным опухолям, существует определенный градиент веществ и некоторое распределение клеток, которое становится более выраженным при увеличении размеров сфероида. Обычно можно выделить внешний слой, где находятся активно делящиеся клетки, средний слой с клетками, нахо-

дящимися в состоянии старения или покоя, и внутренний слой, содержащий клетки, подвергшиеся некрозу [47]. Известно, что некротическая зона внутри опухоли характерна для агрессивных видов рака; ее наличие ассоциировано с метастазированием и плохим прогнозом для пациента [49]. Крупные сфероиды могут достигать диаметра 400–500 мкм и содержать до 20% клеток в состоянии гипоксии. Такая модель хорошо воспроизводит начальную физиологию опухоли: солидные опухоли проходят начальную фазу без сосудов, в которой объем опухоли увеличивается экспоненциально. Считается, что диаметр опухоли не может превысить 1–2 мм без индукции ангиогенеза, поскольку на расстоянии 75–80 мкм от ближайшего сосуда клетки испытывают гипоксию [45].

Трехмерная архитектура сфероидов позволяет изучать барьеры для переноса веществ, градиент pH, градиенты питательных веществ, кислорода и метаболитов, а также исследовать цитотоксичность противоопухолевых препаратов, анализировать патофизиологические градиенты и процессы диффузии лекарственных средств [50, 51]. Поскольку в некротической зоне и в зоне гипоксии реакция среды кислая, противоопухолевое действие слабых кислотных препаратов, таких как митоксантроны и антрациклины, ослабляется, а действие слабощелочных препаратов, таких как хлорамбуцил и митомицин С, усиливается [52].

Методы культивирования сфероидов в целом можно разделить на две большие группы: культивирование с использованием внеклеточного матрикса (extracellular matrix, ECM) или без него (Таблица 2) [53].

Наличие ECM позволяет имитировать естественное микроокружение опухоли не только в плане химического состава и биологических взаимодействий, но и с учетом механических сил, воздействующих на клетки. Наиболее футуристичный способ создания трехмерных структур из живых клеток – это 3D-печать [54], и она тоже относится к группе методов с использованием ECM.

В сфероиде и двумерных культурах клеток может наблюдаться различный профиль экспрессии ключевых маркеров канцерогенеза [55]. Показано, что опухолевые клетки в сфероиде быстро приобретают химиорезистентность к препаратам за счет повышения экспрессии генов, ответственных за остановку клеточного цикла, за репарацию и репликацию ДНК. Подобное увеличение экспрессии отсутствовало в двумерных монослойных культурах [56].

Почти все противоопухолевые препараты показывают меньшую эффективность при тестировании на сфероиде, чем на двумерных культурах клеток [45]. Это обусловлено тремя факторами: разницей

Таблица 2. Методы культивирования сфероидов и органоидов

Метод	Краткое описание	Преимущества	Недостатки
1	2	3	4
Культивирование во внеклеточном матриксе	Клетки смешивают с холодными компонентами матрикса, капли помещают в ячейки микропланшета, при 37 °С матрикс затвердевает	Имитация естественного микроокружения опухолц, имитация взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом	Техническая сложность манипуляций, дороговизна реагентов, сложность контроля над механическими свойствами матрикса, низкая воспроизводимость
Висячая капля	Определенное количество клеток помещают внутрь маленькой капли культуральной среды на крышке чашки Петри, затем крышку переворачивают	Простота, дешевизна, нет необходимости в специализированном оборудовании	Ограниченная воспроизводимость, сложность масштабирования, большая продолжительность эксперимента, сложно контролировать размер сфероидов
Принудительное всплытие	Поверхность ячеек микропланшета покрыта специальным слоем, не позволяющим клеткам прикрепляться, что заставляет клетки формировать агрегаты и всплывать	Простота, применимость для многих типов клеток, возможность работать в широком диапазоне концентраций	Гетерогенность формы и размера получаемых сфероидов, недостаточное проникновение кислорода и питательных веществ в центр сфероидов, дороговизна оборудования, сложность замены питательной среды
Принудительная агрегация в микроячейках	Суспензию клеток наносят в ячейки микропланшета, клетки оседают на дно и там формируют агрегаты	Возможность формирования множества органоидов в одной ячейке, контроль микроокружения, возможность контролировать размер и форму органоидов, возможность высокопроизводительного скрининга	Техническая сложность манипуляций, дороговизна оборудования

Окончание табл. 2 см. на ст. стр.

Окончание табл. 2

1	2	3	4
Магнитное подвешивание	Клетки суспендируют вперемешку с магнитными шариками, они повисают в объеме жидкости при приложении магнитного поля	Единообразии формируемых клеточных агрегатов, возможность передвигать клетки с помощью магнитов, возможность создавать подвижное микроокружение, имитирующее кровотоки	Новизна и недостаточное развитие технологии, дороговизна специализированного оборудования, сложность масштабирования, вопрос совместимости типа клеток с магнитными воздействиями, необходимость удаления магнитных шариков из созданных сфероидов или органоидов
Ротационное культивирование	Сфероиды формируются на микроносителях, которые вращаются в биореакторе	Имитация естественного микроокружения опухоли, воспроизводимость, возможность создавать много органоидов в небольшом объеме	Сложность технологии, дороговизна специализированного оборудования, большое напряжение сдвига для клеток

в микроокружении клеток, пониженной эффективностью диффузии препаратов внутрь сфероидов, а также ограниченной долей пролиферирующих клеток внутри сфероидов, поскольку именно на такие клетки нацелены противоопухолевые препараты [45]. Например, при изучении влияния гемцитабина и оксалиплатина на клетки аденокарциномы поджелудочной железы для достижения одних и тех же значений IC_{50} в случае сфероидов требовались в 200 раз более высокие концентрации данных препаратов, чем в случае двумерных клеточных культур [57].

Таким образом, сфероиды являются моделью еще не васкуляризированной микроопухоли со сходной физиологией. Кроме того, можно получать более сложные модели при совместном культивировании сфероидов с клетками иммунной системы. Показано, что опухоль-ассоциированные фибробласты (cancer-associated fibroblasts, CAF) связаны с процессами инвазии и прогрессирования злокачественных опухолей [58]. Их совместное культивирование с опухолевыми клетками потенцирует рост опухоли. Так, при культивировании сфероидов, полученных на основе фибробластов и опухолевых клеток колоректальной карциномы человека HT-29, было продемонстрировано 1,5-кратное увеличение диаметра двухкомпонентных сфероидов по сравнению с монокомпонентными сфероидными, а также устойчивость к паклитакселу [59].

На сфероидах клеток меланомы было показано, что CAF, включенные в культуру опухолевых сфероидов, клетки стромы в многоклеточных сфероидах меланомы ингибировали инфильтраты иммунных клеток ($\gamma\delta$ -Т-лимфоциты) и уменьшали их цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам. В многоклеточных сфероидах, содержащих дополнительно клетки стромы, $\gamma\delta$ -Т-клетки быстро реагировали на клетки меланомы и проникали в сфероиды меланомы лучше, чем $\alpha\beta$ -Т-клетки в органоиды меланомы, полученные на материале пациента (см. раздел «Органоиды») [60].

На основе сфероидов были предложены высокопроизводительные подходы для оценки цитостатического и цитотоксического действия препаратов, оценки уровня АТФ и других параметров в реальном времени [61].

Сфероиды также используют для имплантации животным [62–64]. Было показано, что подкожная инъекция одного опухолевого сфероиды в Matrigel™ вызывала более отсроченное образование опухоли по сравнению с имплантацией 2D-клеток, обеспечивая повышенную и более стабильную васкуляризацию опухоли и демонстрируя повышенную инфильтрацию эндотелиальных клеток, гемопоэти-

ческих клеток и клеток-предшественников с фенотипом стволовых клеток (c-Kit+ и Sca-1+), а также повышенную экспрессию маркера опухолевых стволовых клеток CXCR4. В модели подкожного сфероиды эффективность антиангиогенной терапии акситинибом превышала таковую в классической модели [63]. Ортопически имплантированные крысам сфероиды глиомы и клетки из двумерной культуры также демонстрировали отличия: опухоль на основе сфероиды характеризовалась более равномерным ростом и более ранней и стабильной васкуляризацией [64].

Неудивительно, что многие препараты, испытанные на двумерных культурах клеток, впоследствии не проходят клинические испытания, так как они в полной мере не отражают морфологию и метаболизм опухоли. Сфероиды являются более адекватной моделью, и их использование в доклинических испытаниях позволяет улучшить результаты скрининга, проведенного на 2D-моделях [65].

Однако, несмотря на то что сфероид более точно имитирует опухолевую ткань, чем двумерная культура клеток, ограниченный рост сфероиды не в полной мере воспроизводит все процессы, происходящие в опухолевом образовании. Также сфероид не воспроизводит опухолевое микроокружение. Разнообразные подходы в конструировании клеточного матрикса и сокультивирование с другими клетками позволяют создавать модели сфероидов с более или менее заданными параметрами. Но, как уже было отмечено выше, картина противоопухолевого ответа меняется в худшую сторону при переходе к более «физиологичным» моделям [63].

PDX-МОДЕЛИ КАК ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ОРГАНОИДОВ

Концепция органоидов, с одной стороны, реализуется на основе методических разработок по получению сфероидов с их трехмерной архитектоникой, а с другой стороны, на PDX-моделях (patient-derived xenograft), основанных на иммунодефицитных мышах, которым впервые был имплантирован опухолевый материал человека. Это позволило наблюдать за развитием новообразования в течение длительного времени в приближенных к человеческому организму физиологических условиях [66, 67]. Первая трансплантация человеческого опухолевого материала мышам была проведена в 1969 году [68].

Для создания PDX можно использовать опухолевый материал пациента, полученный в результате биопсии или резекции опухоли, а также опухолевые клетки, циркулирующие в крови пациента (circulating tumor cells, CTC). Имплантация мышам может проводиться подкожно или ортопически (в тот же орган, из которого взят опухо-

левой материал). Разросшиеся у мышей опухоли можно снова резецировать, разрезать на кусочки размером 2–4 мм и имплантировать новым мышам [69].

Для таких исследований стали использовать гуманизированных мышей. Самые простые модели – это мыши с иммунодефицитом: линия *nude*, у которых отсутствуют зрелые Т-клетки, или мыши с тяжелым комбинированным иммунодефицитом SCID, которые лишены зрелых В- и Т-клеток. Далее были получены линии NOD/SCID, у которых не только отсутствуют зрелые В- и Т-клетки, но и повреждены NK-клетки. У мышей линии NOG/NSG отсутствуют как NK-клетки, так и зрелые В- и Т-клетки [70–72]. Дальнейшее совершенствование этих линий привело к созданию гуманизированных мышей так называемого нового поколения, у которых развиваются опухоли человека в иммунокомпетентном организме [73].

За 2009–2019 год опубликовано множество работ по PDX-моделям, проведен ряд клинических испытаний [70]. Наиболее распространенными PDX-моделями являются модели колоректального рака, рака легких и рака молочной железы [70]. В мире созданы специальные хранилища PDX, в которых содержатся тысячи уже созданных экспериментальных образцов [70, 74]. Главным преимуществом PDX является то, что они сохраняют основные характеристики той опухоли, из которой получен исходный материал, в том числе гетерогенность опухоли, ее геномные и гистологические характеристики. Также важно подчеркнуть, что PDX содержат стромальные и иммунные клетки, полученные от пациента. Таким образом, PDX до определенного момента представляли собой наиболее клинически релевантные модели опухолей для тестирования лекарственных препаратов, позволяющих предсказывать эффективность лечения пациента данными препаратами более точно, чем при использовании какой-либо другой модели опухоли [66, 75, 76].

Создание PDX можно считать успешным, когда получена опухоль, пригодная для следующего пассажа, то есть для повторной имплантации новым мышам. Доля таких успешных экспериментов варьирует от 23 до 75% в зависимости от вида рака [69], причем более агрессивные и активно метастазирующие виды рака позволяют создавать PDX с большей эффективностью [77]. И наоборот, у пациентов, материал которых позволяет создавать PDX с высокой эффективностью, наблюдается большее метастазирование и более низкая общая выживаемость [78].

Например, когда для изучения метастазирующей карциномы почки из материалов пациентов были созданы двумерные клеточные культуры

параллельно с PDX в иммунодефицитных мышах, обе модели хорошо воспроизводили генетические характеристики исходных опухолей. Ответ на лечение сунитинибом (низкомолекулярным ингибитором различных тирозинкиназ) в PDX совпадал с результатами лечения пациентов, а в двумерных клеточных культурах – нет [79].

Несмотря на то, что опухолевые модели PDX поддерживают гетерогенный состав длительное время и максимально имитируют фенотип-генотипические особенности опухоли и ее микроокружение, у моделей этого типа есть и существенные недостатки. По сравнению с клеточными линиями и 3D-органоидами, о которых речь пойдет далее, создание моделей PDX требует больше времени и средств, особенно при использовании гуманизированных мышей (Таблица 1).

Высказывались опасения относительно потенциального генетического дрейфа опухолевых клеток в ксенотрансплантатах поздних пассажей, хотя серьезных генетических различий по крайней мере в течение первых 10 пассажей обнаружено не было [79]. Поэтому общепринятой практикой является ограничение экспериментов PDX менее чем 10 пассажами. При использовании негуманизированных мышей исходные стромальные и иммунные клетки человека заменяются стромальными клетками мыши после серийных пассажей, тем самым теряя вклад стромальных клеток человека в исходную биологию опухоли. В целом, усилия в области методологии создания PDX были направлены на оптимизацию протокола реконструкции опухоли пациента с учетом микроокружения, а также на контроль эффективности и скорости приживления [79].

Нельзя не отметить результаты анализа литературы, проведенного представителями Международного общества защиты животных и Общества защиты животных США [80]. Они сопоставляли исследования в области рака молочной железы, рака легких и колоректального рака, выполненные на животных и на органоидных моделях. Хотя в период с 2014 по 2019 год количество работ с применением органоидов постепенно росло, в подавляющем большинстве работ все же использовали ксенотрансплантаты, введенные мышам (PDX). Учитывая рост финансовой поддержки работ на органоидных моделях [80] вкуче с этическими аспектами использования животных в биомедицинских исследованиях, а также длительность каждого эксперимента на животных моделях, можно надеяться на дальнейшее расширение использования органоидных моделей в онкологии.

ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ ОРГАНОИДОВ

Первые органоиды были получены в 2009 году из стволовых клеток Lgr5(+) крипт тонкого кишечника Сато и соавторами (Институт имени Хюбрехта и Университетский медицинский центр Утрехта, Нидерланды). Сразу были подобраны условия их длительного культивирования. Было определено, что эти «самоорганизующиеся структуры» могут быть получены из одной стволовой клетки [81]. Через 2 года та же группа исследователей создала первые опухолевые органоиды [82].

Органоиды представляют собой сложные трехмерные модели тканей *ex vivo*, которые самоорганизуются и дифференцируются в разные типы клеток, воспроизводя при этом структуру и функцию соответствующего органа *in vivo* [83]. Формально их можно отнести к усложненным клеточным моделям с генотипическими и фенотипическими свойствами организма-донора. Для целей персонализированной медицины используют органоиды, полученные из клеток конкретного пациента (patient-derived organoids, PDO).

Органоиды можно разделить на 4 группы в зависимости от того, из каких клеток они получены: из плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток (embryonic stem cells, ESC), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (induced pluripotent stem cells, iPSC), стволовых клеток взрослого организма (adult stem cells, AdSC), к которым относятся и опухолевые клетки [84–89].

На сегодняшний день получены органоиды не опухолевой природы из различных отделов желудочно-кишечного тракта (желудок, кишечник), паренхиматозных органов (печень, почки, поджелудочная железа) и органов мочевыделительной системы, а также органоиды сосудов и сердечной ткани, органоиды мозга. Для каждого типа органоидов была показана экспрессия тканеспецифических маркерных белков; профиль экспрессии генов и ультраструктура органоидов также были сходны с искомым органом [84, 86–88, 90, 91].

Получение органоидов на основе iPSC является перспективной технологией для моделирования *in vitro* патологий нервной системы и скрининга лекарств [90]. Эта технология все еще находится на начальном этапе развития и имеет некоторые ограничения. Созревание органоидов может занять до года, что заставляет исследователей запускать несколько процессов дифференциации одновременно [91]. Органоиды успешно используются для изучения некоторых наследственных заболеваний. Одним из таких заболеваний является муковисцидоз – системная патология, которая обусловлена мутацией гена трансмембранного регулятора муковисцидоза CFTR [87, 88].

При длительном культивировании органоидов возникает та же проблема, что и при культивировании сфероидов: образование в глубине органоида зоны некроза, обусловленной низким уровнем диффузии туда кислорода и питательных веществ. Для решения таких проблем предлагают использовать компактные и недорогие самодельные мини-биореакторы [91].

III. ОПУХОЛЕВЫЕ ОРГАНОИДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ОТВЕТА И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРЕЦИЗИОННОЙ ТЕРАПИИ

Современные подходы в лечении опухолевых заболеваний все более ориентированы на таргетную терапию и иммунную терапию, хотя существующие традиционные подходы (химиотерапия и гормонотерапия) продолжают использоваться, в том числе в комбинациях с таргетной терапией [92–95]. Огромным преимуществом таргетной терапии является высокая селективность, более низкая токсичность в отдельных случаях по сравнению с химиотерапией [92]. В качестве мишеней таргетной терапии выделяют молекулы, отвечающие за программируемую клеточную гибель, рецепторы к факторам роста, гены, регулирующие пролиферацию, и другие ключевые мишени жизненного цикла клетки [96–97].

Молекулярное профилирование имеет решающее значение для оптимального ведения пациентов, а также для внедрения стандартных методов лечения [98]. Очень важно подтвердить, что предполагаемая мишень действительно вызывает быстрый рост и развитие опухоли, а также подтвердить клиническую значимость потенциальной терапевтической мишени в выбранной стратегии лечения [95]. Таргетное лечение обязательно проходит под контролем молекулярно-генетического исследования биопсийного опухолевого материала [99]. Молекулярное профилирование проводят также на архивных образцах (фиксированных в формалине парафинизированных образцов тканей) с использованием методов секвенирования ДНК/РНК [98]. Кроме того, поворот в сторону индивидуальной высокоточной (прецизионной или персонализированной) медицины при поиске ключевых мишеней и подборе схем лечения рака диктует необходимость оптимизации протоколов доклинического скрининга с подбором прецизионной опухолевой модели. Развитие методов диктует новые требования к опухолевым моделям, и этим требованиям соответствуют модели, полученные из тканей пациентов, отражающие его генотип и фенотип [7].

Один из самых драматичных поворотов противоопухолевой терапии – это возникновение невосприимчивости конкретных пациентов к монотерапии и комбинированной терапии. Причины могут быть разными: индивидуальные генетические различия между клетками одной опухоли, возникновение множественной лекарственной устойчивости, подавление механизмов программируемой клеточной гибели, изменение метаболизма лекарств, изменения эпигенетических и лекарственных мишеней, в том числе опосредованные гипоксией опухоли, усиление репарации ДНК, амплификация генов и др. [100].

По данным Всемирной организации здравоохранения и Национального института канцерогенеза (США), наиболее распространенными видами рака у человека в 2020 году являлись следующие: рак молочной железы – 2,26 млн случаев, рак легких – 2,21 млн, колоректальный рак – 1,93 млн, рак простаты – 1,41 млн, рак кожи – 1,20 млн, рак желудка – 1,09 млн (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>). При этом, по имеющимся данным, рецидивы немелкоклеточного рака легкого возникали в 30–55% случаях [101], рецидивы аденокарцином яичников – в 50–70% [102], биохимический и метастатический рецидив рака простаты – в 17–34% случаев [103].

Мы обнаружили, что за 2021–2022 года на сайте Национальной медицинской библиотеки США по запросу «cancer therapy and PDO» определяется в 2 раза больше публикаций по сравнению с предыдущим периодом. Более расширенные запросы («опухоль» и «резистентность»/«скрининг лекарств»/«прецизионная медицина») определили, что использование органоидов как объектов скрининга для лекарств за 2021–2022 год увеличилось в 4 раза [104].

Растет интерес со стороны фармкомпаний, которые в опухолевых 3D-органоидах видят замену или, как минимум, ключевое дополнение к имеющейся панели доклинического скрининга опухолевых препаратов, а также возможность разработки технологий персонализированного лечения. И вот уже 2023 год ознаменован тем, что FDA одобрил скрининг препаратов на кишечных органоидах для лечения муковисцидоза [105].

Органоидные модели нашли применение для изучения молекулярных механизмов, ответственных за канцерогенез, распространение и прогрессирование опухоли, а также при тестировании новых противоопухолевых соединений. На данный момент из опухолевых клеток пациентов созданы органоиды, служащие моделями ряда опухолей мозга [106], опухолей головы и шеи [107], органов желудочно-кишечного тракта [108], легких [109], печени [2], поджелудочной железы [110], молочной железы [111], яичника [112], почки [113],

мочевого пузыря [114], простаты [115], колоректального рака [116], моделями саркомы [117].

Органоиды могут быть подвергнуты криоконсервации и в случае необходимости вновь реконструированы (выведены из криоконсервации). В различных исследовательских центрах создаются свои биобанки органоидов [89].

Хотя работа с органоидами является существенно более дорогостоящей и медленной, чем работа с двумерными линиями клеток, возможность изучения опухолевых клеток с учетом их микроокружения, а также возможность проведения широкомасштабного скрининга препаратов (Таблица 1) делает органоиды чрезвычайно привлекательным типом экспериментальных опухолевых моделей.

ПОЛУЧЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ ОРГАНОИДОВ

Первичные опухолевые 3D-органоиды, полученные из опухолевой ткани пациента (patient-derived tumor organoids, PDTO), сформированы всеми типами тканеспецифичных клеток. В отличие от иммортализованных линий клеток с неограниченным потенциалом деления, представленных одним клеточным клоном и состоящих из одного типа клеток, а также животных моделей на их основе, PDTO сохраняют геномные и транскриптомные характеристики первичных опухолей на протяжении нескольких месяцев культивирования [82].

Опухолевые клетки из одного и того же образца функционально гетерогенны. В составе опухолевых органоидов, получаемых из фрагментов первичной ткани, присутствуют стволовые клетки, обуславливающие прогресс опухоли и поведение клеток в матриксе [115].

Опухолевые стволовые клетки (cancer stem cells, CSC) представляют собой популяции опухолевых клеток со свойствами самообновления и дифференцировки, они играют ключевую роль в канцерогенезе, инвазии, метастазировании [118]. Если для нормальных стволовых клеток характерно поддержание нормального кариотипа, то опухолевые стволовые клетки *in vitro* демонстрируют определенные генетические aberrации и опухолевые фенотипы, родственные родительски (опухоли пациента). Активация транскрипционных путей, индуцирующих плюрипотентность, присуща агрессивным формам рака [119]. Также высокий риск онкогенеза связывают с некоторыми мутациями онкогенов и/или генов-супрессоров опухолей во время трансформации стволовых клеток в опухолевые клетки [119].

CSC обнаруживаются практически во всех солидных и гематологических опухолях и характеризуются различными поверхностными или внутриклеточными маркерами. Например, в условиях

культивирования ESC и iPSC во многих опухолевых клетках (при колоректальном раке, раке мочевого пузыря, молочной железы, кишечника, предстательной железы и почек) активируются гены, кодирующие белки Oct4, Sox2 и Nanog [120]. Роль этих генов в поддержании плюрипотентности была выяснена в эксперименте Такахаши и Яманаки, которые проанализировали эктопическую экспрессию «эмбриональных факторов» [121]. Важными для создания iPSC оказались белки Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4. С быстрой пролиферацией и поддержанием недифференцированной стадии были связаны гены, кодирующие белки STAT-3, Ras, c-Myc, Klf4 и бета-катенин [122].

На основании этого открытия была разработана технология индуцирования *in vitro* плюрипотентных стволовых клеток, то есть перепрограммирования AdSC в iPSC. За это открытие д-р Яманака был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине в 2012 г. Перепрограммирование AdSC в iPSC используется в изучении процессов канцерогенеза, например, при моделировании гематологических злокачественных заболеваний, первичные образцы которых трудно размножить в культуре без перепрограммирования [122]. При этом опухоли демонстрируют высокую степень устойчивости к клиническому лечению. Эти маркеры можно использовать для разработки опухолеспецифических антител, цитотоксических иммунных клеток, вакцин и прямых иммунных ответов на опухолевые клетки, включая популяции CSC.

В случае солидных опухолей для создания опухолевых 3D-органовидов чаще всего используют AdSC. Это проще, чем получение органовидов из iPSC, поскольку клетки не требуют перепрограммирования [123]. PDT0 получают из хирургически резецированных тканей пациентов [124] или выделенных из крови пациентов единичных циркулирующих опухолевых клеток (CTC) [125].

Органовидные модели, получаемые из CSC, используются в меньшей степени, поскольку CTC редки и могут различаться по фенотипу. При выделении CSC используются приемы обогащения популяции, и на выходе часто наблюдается сниженная жизнеспособность клеток. Важным недостатком является то, что при получении органовидов из CSC в них отсутствуют клетки иммунной системы, васкуляризация и фибробласты. При этом процедура выделения CSC достаточно быстрая (от 20 мин) – таким образом можно получать клеточный материал в дооперационном периоде обследования пациента, например, при раке паренхиматозных органов, раке средостения, раке молочной железы [125].

Опухолевые ткани, полученные от пациента, представляют опухолевый фенотип и естественное опухолевое микроокружение, из них быстрее генерируются органоиды. Согласно ряду протоколов [126, 127], последовательность процедур включает сбор операционного материала (первичные опухоли, метастазы), хранение не более 6–10 часов на льду (не более +4°C), измельчение материала, отмывку, протеолиз коллагенового матрикса, лизирование эритроцитов, сбор и подсчет опухолевых клеток и ресуспендирование в матриксе базальной мембраны (Matrigel™), распределение в предварительно нагретые культуральные планшеты с последующим затвердеванием матрикса в течение 30 мин при 37°C, добавление культуральной среды для органоидов и помещение в клеточный инкубатор при 37°C и 5% CO₂.

К среде для культивирования органоидов предъявляются особые требования [128]. Например, для получения и поддержания органоидов из эпителиальных тканей необходим набор факторов роста, в который входят R-спондины, стимулирующие активность пути Wnt в эпителиальных стволовых клетках, а также Noggin (или Gremlin 1) для ингибирования сигналов дифференцировки от костных морфогенетических белков [128]. Костные морфогенетические белки представляют собой группу сигнальных молекул, относящихся к суперсемейству белков трансформирующего фактора роста-β (TGF-β). Они участвуют в формировании не только костной ткани, но и всех систем органов, отвечают за поддержание гомеостаза в эмбриогенезе и во взрослых тканях [129].

Микроокружение опухоли (tumor microenvironment, TME) – это среда вокруг опухоли, включающая окружающие кровеносные сосуды, иммунные клетки, фибробласты, сигнальные молекулы и внеклеточный матрикс. Опухоль и окружающее микроокружение тесно связаны между собой и постоянно взаимодействуют [130]. В настоящее время опухолевые органоиды разрабатывают с учетом необходимости имитировать нативное микроокружение опухоли, поскольку это улучшает результаты доклинического скрининга и препятствует истощению пула противоопухолевых агентов [131, 14].

В ряде исследований было продемонстрировано успешное применение опухолевых 3D-моделей, полученных методом совместного культивирования клеток: аутологических опухолевых органоидов (PDTO) и лимфоцитов периферической крови. Данные модели имитируют трехмерную архитектуру *in vivo*, содержат набор всего фенотипа ткани, в том числе стволовые клетки и клетки иммунной системы. Компоненты микроокружения опухоли, такие как фибробласты и

иммуноциты, влияют на прогресс опухолевого роста и лекарственную устойчивость [132, 133].

Также можно использовать протоколы дифференцировки для условного перепрограммирования создания систем совместного культивирования опухолевых клеток с иммортализованными аутологичными клетками, например, с облученными фибробластами мыши в присутствии ингибитора Rho-ассоциированной киназы, что позволяет первичным клеткам приобрести свойства стволовых клеток и способность размножаться бесконечно [122].

Важная характеристика опухолевого микроокружения – повышенная концентрация молочной кислоты, которая также нарабатывается в органоидах. В связи с различными условиями иммунные клетки могут по-разному взаимодействовать с опухолевыми клетками в различных модельных системах. Например, цитотоксические Т-лимфоциты успешно распознают антигены CTLA-4 опухолевых клеток в двумерной культуре, но не распознают их в 3D-системе, видимо, из-за повышенного содержания лактата в среде [134]. Вследствие этого не выполняются функции по секреции IFN- γ [135]. Также показано, что повышенное содержание лактата влияет на дифференцировку моноцитов в дендритные клетки [136].

Стоит отметить, что трёхмерные модели *in vivo* стабильно демонстрируют мутационный профиль первичной опухоли пациента и могут быть также криоконсервированы и в случае необходимости выведены из криоконсервации в целях изучения и внедрения новых компонентов (таких, как опухолевое микроокружение, сосудистая сеть), создания более сложных 3D-моделей на их основе [137].

Для получения необходимых факторов роста обычно используют специальные клеточные линии-продуценты, секретирующие факторы роста в среду. Но можно использовать кондиционную среду от самих клеток хозяина, которые естественным образом секретируют данные факторы роста. Высокая стоимость данных компонентов, так же как низкая доступность линий-продуцентов ограничивает их использование в масштабных экспериментах [128]. Для создания улучшенной органоидной культуры, включающей компоненты микроокружения, применяются такие методологические разработки, как интерфейс воздух–жидкость (air–liquid interface, ALI) или микрофлюидные 3D-культуральные системы [123, 129].

В качестве трёхмерных матриц для роста 3D-клеточных моделей предлагаются различные материалы. Наиболее популярная система Matrigel™ [138] представляет собой растворимый экстракт белков базальной мембраны, впервые выделенный из опухоли саркомы

мышь в 1977 году, формирующий трехмерный матрикс при 37°C. Аналогичные ей гидрогелевые системы разработаны на основе гиалуроновой кислоты, что позволяет имитировать реципрокные взаимодействия с опухоль-ассоциированной стромой [139]. Также для создания каркасов и композитных матриц предлагают использовать поли(ϵ -капролактон)-трикальцийфосфат [140]. При этом необходимо принимать во внимание, что гидрогели, полученные из тканей животных, подвержены вариациям [141], а гидрогели, полученные с использованием синтетических полимеров, физиологически нерелевантны [142].

Преимущества использования ЕСМ заключаются в том, что клетки в трехмерных гидрогелях собираются в сферические туморойды, образуют тесные клеточные контакты за счет E-кадгерина и демонстрируют кортикальную организацию F-актина. В 3D-моделях по сравнению с двумерными культурами значительно повышена экспрессия некоторых проангиогенных факторов; это продемонстрировано, по крайней мере, для двух из них: фактора роста эндотелия сосудов-165 (VEGF-165) и интерлейкина-8 (IL-8) [139]. Улучшенные их формулы применяются *in vivo* для усиления ангиогенеза и приживаемости имплантов [143, 144].

Интересной модельной системой является ЕСМ на основе полиэтиленгликоля. Она характеризуется программируемой разветвленностью и плотностью, сниженной адгезией для белков и опосредованной этим сниженной клеточной адгезией, а также управляемой биоактивностью (включение различных биоактивных пептидов в цепи полиэтиленгликоля). Такая модельная система упрощала изучение васкуляризации опухоли и позволяла проследить взаимодействия опухолевых структур, эндотелиальных клеток и перицитов *in vitro* в присутствии и в отсутствие трансформирующего фактора роста TGF- β 1 [145].

В настоящее время все более уделяется внимание методологической базе для создания релевантных органоидов. Для этого используют биоинженерные подходы, включая изготовление специальных биоматериалов и каркасов, биопечать и микрофлюидику, подключение передовых вычислительных методик, включая молекулярное профилирование и биоинформатику. Системы «опухоль на чипе», представляющие собой микрофлюидные устройства, призваны в некоторой степени заменить мышь, которым имплантируют PDX или PDTO. Такие устройства воссоздают патофизиологию опухоли, обеспечивают непрерывную подачу питательных веществ и фармакологических субстанций. Их дополняют 3D-биопечатью, вычисли-

тельной гидродинамикой и «омиксными» технологиями [146]. Это должно облегчить процесс использования опухолевых органоидов в качестве новой платформы для скрининга лекарств, для выявления потенциальных механизмов уничтожения клеток и разработки прецизионных методов лечения [147].

PDTO КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ И ИММУНОТЕРАПИИ

За время существования данной технологии проведен ряд исследований по определению чувствительности PDTO к химиотерапии, полученные результаты сопоставлены с клиническим эффектом от терапии. В модели PDTO рака молочной железы были обнаружены значительные различия в чувствительности к цисплатину, венетоклаксу (новому ингибитору Vcl-2) и S63845 (новому ингибитору MCL1): двумерные клеточные культуры демонстрировали более высокую чувствительность к низким дозам лекарственного средства, тогда как в случае PDTO эффективность проявлялась при более высоких дозах [148]. С помощью органоидов, полученных на основе операционного материала пациентов, больных колоректальным раком раком IV стадии с метастазами в печень, была определена чувствительность к моно- и комбинированной химиотерапии в послеоперационном периоде. Органоиды из опухолевого материала у 38 пациентов проявляли чувствительность к химиотерапии, а у 76 пациентов имели лекарственную устойчивость. При этом медианная выживаемость составила 16,0 месяцев в группе с лекарственной чувствительностью и 9,0 месяцев в группе с лекарственной устойчивостью ($p < 0,001$) [126]. Показано, что персонализация режимов полихимиотерапии путем исключения веществ с низкой эффективностью может привести к менее серьезным побочным эффектам, с возможностью более широкого выбора неoadъювантной и адъювантной схем терапии [149].

Проведен ряд исследований на органоидах как модели для выяснения механизмов лекарственной устойчивости. Проведенные исследования можно сгруппировать по некоторым критериям: прямое сравнение образцов и органоидов до и после химиотерапии, также исследования на органоидах по приобретенной лекарственной устойчивости в процессе лечения, а также эксперименты на резистентных к химиотерапии органоидах [104].

Чувствительность к лекарственным препаратам, определенная с использованием органоидов, коррелировала с фактической терапевтической эффективностью в случае рака желудка (химиотерапия на основе цисплатина и 5-фторурацила) [150], рака мочевого пузыря [150], рака молочной железы, рака пищевода [151]. Устойчивость к

цисплатину воспроизводилась в органоидах, полученных из цисплатин-резистентной мезотелиомы [151]. Исследования органоидных образцов рака прямой кишки, не подвергавшихся лечению и депонированных в биобанках, показали, что результаты исследований органоидной химио-лучевой терапии соответствовали фактическим клиническим результатам [152]. В целом был сделан вывод о целесообразности таких испытаний [104].

Таргетная терапия – это терапия, направленная на определенную мишень (дефектный ген или экспрессируемый аномальный белок), задействованную в росте опухолевых клеток и их выживании. В этом состоит отличие от химиотерапии, которая неселективна и воздействует на все быстро делящиеся клетки. Потенциальные молекулярные мишени обнаруживаются путем тестирования образца опухоли на сверхэкспрессию биомаркеров или мутаций, вызывающих быстрое размножение клеток [92]. В зависимости от типа молекулярных мишеней таргетная терапия может воздействовать на антигены клеточной поверхности, факторы роста, рецепторы, сигнальные пути, которые регулируют клеточный цикл, гибель клеток, метастазирование и ангиогенез [92]. Большинство таргетных препаратов представляют собой моноклональные антитела или низкомолекулярные препараты [92].

В настоящее время органоидные опухолевые модели активно применяются для тестирования новых и уже имеющихся таргетных противоопухолевых препаратов [104]. Так, органоиды метастазирующей меланомы с тандемной мутацией в гене *BRAF* (V600E и K601Q) были использованы для изучения эффективности таргетной терапии вемурафенибом и кобиметинибом. Молекулярный докинг подтвердил сниженное сродство мутантного белка к вемурафенибу, при этом сохранялась чувствительность к комбинации двух препаратов. Ингибирование передачи сигналов Notch с помощью нирогацестата позволило добиться большего противоопухолевого ответа [153]. При раке яичников наименьшая терапевтическая эффективность этопозида была продемонстрирована в той органоидной модели, которая была создана на основе опухолей, проявивших клиническую устойчивость к этому препарату [154].

Слепое исследование с использованием 77 органоидов, полученных от 57 пациентов, страдающих колоректальным раком 4 стадии, продемонстрировало, что органоидные модели позволяют довольно точно предсказывать ответ пациента на химиотерапию (чувствительность 63%, специфичность 94% и точность 80%) [155]. Показано, что у пациентов с плохим прогнозом возможно достичь улучшений, сменив

стандартную терапию на препараты, индивидуально подобранные в ходе скрининга с использованием PDTO. Однако, к сожалению, не всегда возможно обеспечить доступ пациента к подобранному таким образом препарату [156].

В проспективном клиническом исследовании с использованием органоидов метастазирующего колоректального рака был получен 31 органоид из опухолевого материала пациентов, из них 19 органоидов оказались чувствительными к одному или нескольким агентам (в том числе к ингибитору mTOR вистусертибу и ингибитору протеинкиназы В капивасертибу) [80]. Однако у пациентов не наблюдалось успешного клинического ответа на рекомендованную терапию. Авторы исследования предполагают, что лучших результатов можно будет добиться за счет оптимизации условий культивирования органоидов. Также они предлагают в начале исследования более строго отбирать пациентов, поскольку сильно истощенным пациентам не помогает никакая терапия.

В отличие от химиотерапии, основанной на повреждении быстро делящихся клеток химическими препаратами, иммунотерапия фокусируется на сложных взаимодействиях между опухолевыми клетками и клетками иммунной системы. Для изучения таких взаимодействий до этого использовали PDX-модели. Считается, что 3D-опухолевые органоиды могут в ближайшее время частично заменить эти модели [157].

Более простая и не настолько дорогая модель, какой является PDX, это культивирование опухолевых органоидов совместно с иммунными клетками. При этом могут использоваться иммунные клетки из разных источников. Аутологичные иммунные клетки получают от того же донора, что и опухоль; такая экспериментальная модель наиболее близка к ситуации *in vivo* и наиболее желательна для целей персонализированной медицины. Наиболее подходящие для этой модели иммунные клетки – это лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (tumor infiltrating lymphocytes, TILs), поскольку они уже встречались с опухолевыми антигенами и компонентами микроокружения опухоли [158]. TILs можно выделить из остатков опухоли, которую использовали для создания органоидов [159]. Другой вариант аутологичных иммунных клеток – это мононуклеарные клетки периферической крови пациента, получить которые значительно проще, чем TILs. Также возможно культивирование органоидов с аллогенными иммунными клетками, т.е. полученными от другого донора. Существенным недостатком такой экспериментальной модели является иммунный ответ из-за различия в главном комплексе гистосовместимости, который может заслонить все прочие биологические эффекты.

Сложность совместного культивирования заключается в том, что не существует питательной среды, одинаково подходящей разным типам клеток [158]. Обычно органоиды и иммунные клетки поначалу растут по отдельности. Для органоидов используют среду, содержащую фактор стволовых клеток и специфические факторы роста, причем эти факторы различаются у разных типов органоидов. Для иммунных клеток обычно используют среды RPMI 1640, DMEM или MEM. В них отсутствует фактор стволовых клеток, и потому органоиды в них не растут [158]. В свою очередь, иммунные клетки способны расти в средах для органоидов, но некоторые компоненты этих сред могут их угнетать (например, никотинамид [160]). Таким образом, перед началом совместного культивирования каждого типа органоидов с иммунными клетками необходим подбор оптимальной среды. Работа в области персонализированной медицины начинается с персонализированной биологии.

В современной иммунотерапии можно выделить 5 типов препаратов [161]:

- (1) антитела, блокирующие контрольные точки иммунного ответа (immune checkpoint blockers, ICB; immune checkpoint inhibitors, ICI),
- (2) непосредственные модуляторы иммунитета,
- (3) Т-клетки с химерными рецепторами антигенов (chimeric antigen receptor, CAR) [162],
- (4) онколитические вирусы [163] и
- (5) противоопухолевые вакцины [164].

ICB – это препараты, позволяющие активировать собственные иммунные клетки пациента для борьбы с опухолью. Их механизм действия направлен на восстановление нормального противоопухолевого иммунного ответа путём блокирования ингибиторных рецепторов Т-лимфоцитов – ключевых точек иммунитета: антигена 4-го типа, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA-4), и белка программируемой клеточной гибели (PD-1), его лигандов PD-L1 и PD-L2, а также связанных с ними ингибиторных сигналов, позволяющих опухолевым клеткам уклоняться («ускользнуть») от иммунологического надзора. На текущий момент из данной группы для клинического применения одобрены FDA девять препаратов, нацеленных на четыре разных молекулярных мишени: CTLA-4, PD-1, PD-L1 и LAG-3 [162, 165, 166]. Первым из них был ипилиумаб – моноклональное антитело к CTLA-4, одобренное для лечения меланомы в 2011 году. Возможна комбинаторная терапия, сочетающая антитела к LAG3 с антителами к CTLA-4 или PD-1.

Разные виды рака с разной эффективностью отвечают на терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа. Например,

аденокарцинома протока поджелудочной железы не поддается этому виду лечения вовсе [167]. Кроме того, как и в случае классической терапии, в процессе лечения возможно возникновение устойчивости к используемым препаратам.

В сравнительных экспериментах изучали цитотоксическую активность инфильтрирующих Т-лимфоцитов в опухолевых органоидах на основе клеток резецированной меланомы и в сфероидах трех видов (только опухолевые клетки меланомы; опухолевые клетки меланомы, сокультивированные в сфероиде с фибробластами; трехкомпонентные сфероиды на основе опухолевых клеток меланомы, фибробластов и стромальных клеток). Было продемонстрировано четкое различие между релевантностью изученных моделей. Цитотоксические возможности лимфоцитов, в том числе их инфильтрационная способность, снижались по мере усложнения матрикса и окружения в сфероидах. Наименьшую способность к инфильтрации Т-лимфоциты продемонстрировали в 3D-органоидах. При этом обработка органоидов ингибиторами контрольных точек приводила к усилению противоопухолевого действия Т-клеток. Таким образом, при усложнении модели и приближении ее к опухоли *in vivo* возникал ряд ограничений для клеток иммунной системы [60].

Порядка 1600–1700 международных заявок на патенты опубликовано в 2018–2019 годах, каждый успешный препарат проходит порядка 400–1200 клинических испытаний [165]. Поскольку иммунотерапия является весьма дорогостоящим видом лечения, не лишенным при этом побочных эффектов, крайне желательно иметь экспериментальную модель, полученную из тканей конкретного пациента, на которой можно было бы проверять эффективность различных препаратов до того, как выписывать их пациенту. Такими моделями могут быть РДТО, культивируемые совместно с аутологичными иммунными клетками [168–170].

В индукции апоптоза опухолевых клеток задействованы каскадные механизмы иммунной системы [171]. Так, например, на колоректальных органоидах удалось оценить терапевтический потенциал иммуномодулирующих антител, нацеленных на иммуносупрессорные лиганды МІСА/В и NKG2A на поверхности опухолевых клеток, при их сокультивировании с аллогенными Т-лимфоцитами и НК-клетками. Лимфоциты быстро инфильтрировали органоиды, вызывая иммунопосредованный апоптоз опухолевых клеток и разрушение органоидов [172].

Таким образом, возможность имитировать систему «первичная опухоль – иммунитет – опухолевое микроокружение» в каждом

отдельно рассматриваемом случае, позволяет учесть механизмы иммуноопосредованного апоптоза опухолевых клеток, что возможно в опухолевой 3D-модели органоидов. Такой подход способствует оптимизации и обоснованному выбору эффективной монотерапии или сочетанной терапии, тем самым повышая шансы пациента на благоприятный исход.

PDTO КАК МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ CRISPR–CAS9 РЕДАКТИРОВАНИЯ

И наконец, необходимо упомянуть возможность диверсификации органоидных моделей с помощью таких инструментов редактирования генома, как CRISPR–Cas9. Используя CRISPR–Cas9, российские ученые создали линию iPSC человека, в которой нокаутирован ген бета-2-микроглобулина. В таких клетках нарушено образование гетеродимера человеческого лейкоцитарного антигена (HLAI). Следовательно, полученные клетки обладают сниженной иммуногенностью, что чрезвычайно важно с точки зрения иммунологической совместимости при аллогенных трансплантациях [173]. О получении органоидов на основе этой линии iPSC пока не сообщалось.

Редактирование с помощью CRISPR–Cas9 использовали для решения проблем множественной лекарственной устойчивости, продемонстрированной на линии рака яичников [174] и линиях остеосаркомы KHO SR2 и U-2OSR2 [175]. Три единые гидовые РНК (sgRNA, single guide RNA) были нацелены на четвертый и пятый экзоны человеческого гена *ABCBI*, кодирующего белок множественной лекарственной устойчивости. Эффективное подавление данного гена позволило восстановить чувствительность к доксорубину [174, 175].

Разработанные на сегодняшний день компоненты CRISPR, специфичные для определенных нуклеотидных последовательностей, могут при одновременном введении нескольких гидовых РНК осуществлять мультиплексное редактирование целевых локусов [176]. Очевидно, что использование таких подходов для редактирования генома в органоидах является более сложной задачей, чем аналогичная работа в двумерной культуре клеток. Однако органоиды можно считать одной из самых физиологически адекватных на сегодняшний день модельных систем для редактирования генов (knock-out, knock-in) с использованием инструмента CRISPR–Cas9. Подобные модели могут ускорить внедрение данного метода в клиническую практику, особенно в таком виде работ, как проверка на эффективность и безопасность [177]. Более того, органоиды при клональном размножении способствуют созданию CRISPR-опосредованных изогенных 3D-культур, содержащих специфические мутации, которые можно

использовать для скрининга эффективности и открытия лекарств *de novo* [81, 177].

Большинство органоидных моделей, созданных с помощью CRISPR, используются для изучения канцерогенеза. Они основаны на накоплении драйверных мутаций, введении нокаутных мутаций, мультиплексных мутаций. Полученные органоиды можно трансплантировать мышам для выявления минимальных условий для онкогенеза и метастазирования [178]. Однако использование генетически отредактированных органоидных моделей возможно и при исследовании других заболеваний. Так, в Институте имени Хюбрехта (Нидерланды) сообщили о получении отредактированных органоидов, созданных из фетальных гепатоцитов человека, и показали, что влияние однонуклеотидных замен на риск стеатоза печени можно устранить благодаря точному редактированию генов [179]. Разработанные органоидные модели в сочетании с набором инструментов CRISPR легли в основу платформы, позволяющей идентифицировать мишени неалкогольной жировой болезни печени и неалкогольного стеатогепатита [179].

Немаловажным для прецизионного редактирования генома является возможность высокоточного мечения геномных локусов на основе инактивированных эндонуклеаз dCas9. Подобное прижизненное мечение позволяет визуализировать правильность посадки dCas9 с различными гидовыми РНК в экспериментах по редактированию, а также осуществлять визуализацию близких взаимодействий, в том числе на основе индуктивно-резонансного переноса энергии (FRET) [38, 178].

В области имиджинга, основанного на системе CRISPR–Cas9, перспективным является подход, при котором в состав гидовой РНК включаются короткие РНК-аптамеры. Можно подобрать такие аптамеры, которые способны специфически связывать нетоксичные низкомолекулярные лиганды, испускающие флуоресценцию после связывания с аптамером. В свою очередь, такие лиганды могут нести дополнительную парамагнитную метку (контрастное вещество для магнитно-резонансной томографии) [180]. Чувствительность таких методов должна позволить детектировать молекулярные события на уровне целого организма. CRISPR-опосредованные изогенные органоиды являются перспективным объектом для такой мультимодальной визуализации.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы попытались проанализировать ключевые изменения, произошедшие в области разработки опухолевых моделей, традиционно используемых для скрининга противоопухолевых препаратов и изучения механизмов противоопухолевого действия. Все модели, от двумерных клеточных культур и до мышинных моделей, не потеряли своей актуальности, но регламент их использования изменился в связи с новыми требованиями по гено- и фенотипированию опухолей и опухолевых мишеней.

Модели, получаемые из клеток пациентов (клеточные линии, органоиды, условно перепрограммированные клетки, PDX), гено- и фенотипически идентичны исходным организмам. Органоидные опухолевые модели считаются наиболее физиологически релевантными. Они могут включать различные популяции клеток, отражают пространственную организацию исходной ткани, функциональные проявления генотипических особенностей исходной опухоли, метаболические параметры канцерогенеза. Они необходимы как для фундаментальных, так и для прикладных исследований в области онкологии. Данные модели представляют интерес для геномного редактирования с использованием системы CRISPR–Cas9: возможно получение CRISPR-опосредованных изогенных 3D-культур для скрининга противоопухолевых препаратов и изучения лекарственной устойчивости.

На данный момент вероятность успешного прохождения клинических испытаний для новых противоопухолевых препаратов оценивается как 13,4% [181]. Предполагается, что именно новые доклинические модели должны снизить количество неудач в клинических испытаниях. На сайте ClinicalTrials.gov по состоянию на июнь 2022 года было зарегистрировано 112 исследований с ключевыми словами «органотидный рак» [104]. На сегодняшний день трехмерные тканеспецифичные опухолевые модели, созданные на основе опухолевых органоидов, перепрограммированных клеток микроокружения и клеток иммунной системы, можно считать наиболее релевантными для определения чувствительности к таргетной терапии и противоопухолевой иммунотерапии.

При этом необходимый анализ и подбор терапии должен происходить в кратчайшие сроки, что подразумевает тесное взаимодействие исследовательской лаборатории с клиникой. В идеале это должно достаточно быстро находить отклик в клинических прецизионных протоколах лечения. Современное прецизионное лечение должно

строиться не на методе «проб и ошибок», как отмечают в экспертном сообществе, а должно быть научно обосновано [182].

Национальный институт онкологии (США), фонд Hubrecht Organoid Technology (Нидерланды), Центр исследования рака Великобритании и Институт имени Сэнгера (Великобритания) реализуют Инициативу по моделям рака человека (HCMI) (<https://www.sanger.ac.uk/collaboration/human-cancer-models-initiative-hcmi/>), задачами которой являются разработка и генетическая характеристика опухолевых органоидных моделей следующего поколения и их банкирование.

При этом в Российской Федерации только обозначается вектор развития персонализированных подходов. Данное направление требует создания соответствующей нормативно-правовой базы [184], пока опирающейся лишь на два основных законодательных акта: 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах» и Решение Евразийской комиссии 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (<https://pharmmedprom.ru/articles/personifitsirovannaya-meditsina-v-rossii-budushee-uzhe-pochtizdes/>).

Таким образом, необходимо форсировать развитие данного направления в РФ, чтобы таргетная терапия и иммунотерапия, предписанные клиническими протоколами, могли базироваться на более четких персональных рекомендациях, что положительно отразится на результате лечения и качестве жизни пациентов.

Авторы выражают глубокую благодарность доктору биологических наук ведущему научному сотруднику ФГБУ «НМИЦ радиологии» МЗ РФ МНИОИ имени П.А. Герцена Ольге Алексеевне Безбородовой за ценные замечания и советы при подготовке обзора.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F. (2021) Cancer statistics for the year 2020: An overview, *International Journal of Cancer*, **149**, 778–789.
2. Chen, A., Neuwirth, I., Herndler-Brandstetter, D. (2023) Modeling the tumor microenvironment and cancer immunotherapy in next-generation humanized mice, *Cancers (Basel)*, **15**, 2989.
3. Dutta, D., Heo, I., Clevers, H. (2017) Disease modeling in stem cell-derived 3D organoid systems, *Trends in Molecular Medicine*, **23**, 393–410.
4. Xiao, Y., Yu, D. (2021) Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer, *Pharmacology & Therapeutics*, **221**, 107753.
5. Xia, T., Du, W., Chen, X., Zhang, Y. (2021) Organoid models of the tumor microenvironment and their applications, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **25**, 5829–5841.
6. Zhao, J., Fong, A., Seow, S.V., Toh, H.C. (2023) Organoids as an enabler of precision immuno-oncology, *Cells*, **12**, 1165.
7. Napoli, G.C., Figg, W.D., Chau, C.H. (2022) Functional drug screening in the era of precision medicine, *Frontiers in Medicine*, **9**, 912641.
8. Brown, J.M. (1997). NCI's anticancer drug screening program may not be selecting for clinically active compounds, *Oncology Research*, **9**, 213–215.
9. Dahodwala, H., Lee, K.H. (2019) The fickle CHO: a review of the causes, implications, and potential alleviation of the CHO cell line instability problem, *Current Opinion in Biotechnology*, **60**, 128–137.
10. Bakhoun, S.F., Ngo, B., Laughney, A.M., Cavallo, J.A., Murphy, C.J., Ly, P., Shah, P., Sriram, R.K., Watkins, T.B.K., Taunk, N.K., et al. (2018). Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response, *Nature*, **553**, 467–472.
11. Wu, S., Bafna, V., Chang, H.Y., Mischel, P.S. (2022) Extrachromosomal DNA: An emerging hallmark in human cancer, *Annual Review of Pathology*, **17**, 367–386.
12. He, J., Huang, Z., Han, L., Gong, Y., Xie, C. (2021) Mechanisms and management of 3rd-generation EGFR-TKI resistance in advanced non-small cell lung cancer (Review), *International Journal of Oncology*, **59**, 90.
13. Hirano, T., Yasuda, H., Tani, T., Hamamoto, J., Oashi, A., Ishioka, K., Arai, D., Nukaga, S., Miyawaki, M., Kawada, I., et al. (2015) In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer, *Oncotarget*, **6**, 38789–38803.
14. Huo, K.G., D'Arcangelo, E., Tsao, M.S. (2020) Patient-derived cell line, xenograft and organoid models in lung cancer therapy, *Translational Lung Cancer Research*, **9**, 2214–2232.
15. Barretina, J., Caponigro, G., Stran-sky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehár, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., et al. (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity, *Nature*, **483**, 603–607.
16. Garnett, M.J., Edelman, E.J., Heidorn, S.J., Greenman, C.D., Dastur, A., Lau, K.W., Greninger, P., Thompson,

- I.R., Luo, X., Soares, J., et al. (2012) Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells, *Nature*, **483**, 570–575.
17. Yang, W., Soares, J., Greninger, P., Edelman, E.J., Lightfoot, H., Forbes, S., Bindal, N., Beare, D., Smith, J.A., Thompson, I.R., et al. (2012) Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells, *Nucleic Acids Research*, **41**, 955–961.
 18. Iorio, F., Knijnenburg, T.A., Vis, D.J., Bignell, G.R., Menden, M.P., Schubert, M., Aben, N., Gonçaves, E., Barthorpe, S., Lightfoot, H., et al. (2016) A landscape of pharmacogenomic interactions in cancer, *Cell*, **166**, 740–754.
 19. Basu, A., Bodycombe, N.E., Cheah, J.H., Price, E.V., Liu, K., Schaefer, G.I., Ebricht, R.Y., Stewart, M.L., Ito, D., Wang, S., et al. (2013) An interactive resource to identify cancer genetic and lineage dependencies targeted by small molecules, *Cell*, **154**, 1151–1161.
 20. Haverty, P.M., Lin, E., Tan, J., Yu, Y., Lam, B., Lianoglou, S., Neve, R.M., Martin, S., Settleman, J., Yauch, R.L., et al. (2016) Reproducible pharmacogenomic profiling of cancer cell line panels, *Nature*, **533**, 333–337.
 21. Klijn, C., Durinck, S., Stawiski, E.W., Haverty, P.M., Jiang, Z., Liu, H., Degenhardt, J., Mayba, O., Gnad, F., Liu, J., et al. (2014) A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines, *Nature Biotechnology*, **33**, 306–312.
 22. Lamb, J., Crawford, E.D., Peck, D., Modell, J.W., Blat, I.C., Wrobel, M.J., Lerner, J., Brunet, J.P., Subramanian, A., Ross, K.N., et al. (2006) The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease, *Science (New York, N.Y.)*, **313**, 1929–1935.
 23. Subramanian, A., Narayan, R., Corsello, S.M., Peck, D.D., Natoli, T.E., Lu, X., Gould, J., Davis, J.F., Tubelli, A.A., Asiedu, J.K., et al. (2017) A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles, *Cell*, **171**, 1437–1452.e17.
 24. Berish, R.B., Ali, A.N., Telmer, P.G., Ronald, J.A., Leong, H.S. (2018) Translational models of prostate cancer bone metastasis, *Nature Reviews. Urology*, **15**, 403–421.
 25. Onaciu, A., Munteanu, R., Munteanu, V.C., Gulei, D., Raduly, L., Feder, R.I., Pirlog, R., Atanasov, A.G., Korban, S.S., Irimie, A., et al. (2020) Spontaneous and induced animal models for cancer research, *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, **10**, 660.
 26. Valcourt, D.M., Kapadia, C.H., Scully, M.A., Dang, M.N., Day, E.S. (2020) Best practices for preclinical in vivo testing of cancer nanomedicines, *Advanced Healthcare Materials*, **9**, e2000110.
 27. Santana-Krímskaya, S.E., Kawas, J.R., Zarate-Triviño, D.G., Ramos-Zayas, Y., Rodríguez-Padilla, C., Franco-Molina, M.A. (2022) Orthotopic and heterotopic triple negative breast cancer preclinical murine models: A tumor microenvironment comparative, *Research in Veterinary Science*, **152**, 364–371.
 28. Madonna, M.C., Duer, J.E., Lee, J.V., Williams, J., Avsaroglu, B., Zhu, C., Deutsch, R., Wang, R., Crouch, B.T., Hirschey, M.D., et al. (2021) In vivo optical metabolic imaging of long-chain fatty acid uptake in orthotopic models of triple-negative breast cancer, *Cancers*, **13**, 148.
 29. Hagens, M.J., Oprea-Lager, D.E., Vis, A.N., Wondergem, M., Donswijk, M.L., Meijer, D., Emmett, L., van Leeuwen, P.J., van der Poel, H.G.

- (2022). Reproducibility of PSMA PET/CT imaging for primary staging of treatment-naïve prostate cancer patients depends on the applied radiotracer: a retrospective study, *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, **63**, 1531–1536.
30. Schmidt, K.M., Geissler, E.K., Lang, S.A. (2016) Subcutaneous murine xenograft models: a critical tool for studying human tumor growth and angiogenesis in vivo, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **1464**, 129–137.
31. Sobczuk, P., Brodziak, A., Khan, M.I., Chhabra, S., Fiedorowicz, M., Welniak-Kamińska, M., Synoradzki, K., Bartnik, E., Cudnoch-Jędrzejewska, A., Czarnecka, A.M. (2020) Choosing the right animal model for renal cancer research, *Translational Oncology*, **13**, 100745.
32. Zheng, H., Xue, H., Yun, W.J. (2023) An overview of mouse models of hepatocellular carcinoma, *Infectious Agents and Cancer*, **18**, 49.
33. Zherdeva, V., Kazachkina, N.I., Shcheslavskiy, V., Savitsky, A.P. (2018). Long-term fluorescence lifetime imaging of a genetically encoded sensor for caspase-3 activity in mouse tumor xenografts, *Journal of Biomedical Optics*, **23**, 1–11.
34. Momcilovic, M., Jones, A., Bailey, S.T., Waldmann, C.M., Li, R., Lee, J.T., Abdelhady, G., Gomez, A., Holloway, T., Schmid, E., et al. (2019) In vivo imaging of mitochondrial membrane potential in non-small-cell lung cancer, *Nature*, **575**, 380–384.
35. Shirmanova, M.V., Druzhkova, I.N., Lukina, M.M., Matlashov, M.E., Belousov, V.V., Snopova, L.B., Prodanetz, N.N., Dudenkova, V.V., Lukyanov, S.A., Zagaynova, E.V. (2015) Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new genetically encoded sensor SypHer2. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1850**, 1905–1911.
36. Shirshin, E.A., Shirmanova, M.V., Gayer, A.V., Lukina, M.M., Nikonova, E.E., Yakimov, B.P., Budylin, G.S., Dudenkova, V.V., Ignatova, N.I., Komarov, D.V., et al. (2022) Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: The quest for metabolic heterogeneity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **119**, e2118241119.
37. Kazachkina, N.I., Zherdeva, V.V., Meerovich, I.G., Saydasheva, A.N., Solovyev, I.D., Tuchina, D.K., Savitsky, A.P., Tuchin, V.V., Bogdanov, A.A., Jr. (2022) MR and fluorescence imaging of gadobutrol-induced optical clearing of red fluorescent protein signal in an in vivo cancer model, *NMR in Biomedicine*, **35**, e4708.
38. Maloshenok, L., Abushinova, G., Kazachkina, N., Bogdanov, A., Jr., Zherdeva, V. (2023) Tet-regulated expression and optical clearing for in vivo visualization of genetically encoded chimeric dCas9/fluorescent protein probes, *Materials (Basel, Switzerland)*, **16**, 940.
39. Nicolson, F., Andreiuk, B., Andreou, C., Hsu, H.T., Rudder, S., Kircher, M.F. (2019) Non-invasive in vivo imaging of cancer using surface-enhanced spatially offset raman spectroscopy (SESORS), *Theranostics*, **9**, 5899–5913.
40. Xu, X., An, H., Zhang, D., Tao, H., Dou, Y., Li, X., Huang, J., Zhang, J. (2019) A self-illuminating nanoparticle for inflammation imaging and cancer therapy, *Science Advances*, **5**, eaat2953.
41. Chen, L., Zuo, W., Xiao, Z., Jin, Q., Liu, J., Wu, L., Liu, N., Zhu, X. (2021) A carrier-free metal-coordinated dual-photosensitizers nanotheranostic with glutathione-

- depletion for fluorescence/photoacoustic imaging-guided tumor phototherapy, *Journal of Colloid and Interface Science*, **600**, 243–255.
42. Mohiuddin, T.M., Zhang, C., Sheng, W., Al-Rawe, M., Zeppernick, F., Meinhold-Heerlein, I., Hussain, A.F. (2023) Near infrared photoimmunotherapy: A review of recent progress and their target molecules for cancer therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 2655.
 43. Bezborodova, O.A., Alekseenko, I.V., Nemtsova, E.R., Pankratov, A.A., Filyukova, O.B., Yakubovskaya, R.I., Kostina, M.B., Potapov, V.K., Sverdlov, E.D. (2018) The antitumor efficacy of a complex based on two-vector system for coexpression of the suicide gene Fc γ 1 and Cre recombinase, *Doklady Biochemistry and Biophysics*, **483**, 326–328.
 44. Johnson, J.I., Decker, S., Zaharevitz, D., Rubinstein, L.V., Venditti, J.M., Schepartz, S., Kalyandrug, S., Christian, M., Arbuck, S., Hollingshead, M., et al. (2001) Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials, *British Journal of Cancer*, **84**, 1424–1431.
 45. Doctor, A., Seifert, V., Ullrich, M., Hauser, S., Pietzsch, J. (2020) Three-dimensional cell culture systems in radiopharmaceutical cancer research, *Cancers (Basel)*, **12**, 2765.
 46. Inch, W.R., McCredie, J.A., Sutherland, R.M. (1970). Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture, *Growth*, **34**, 271–282.
 47. Mehta, G., Hsiao, A.Y., Ingram, M., Luker, G.D., Takayama, S. (2012) Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy, *Journal of Controlled Release*, **164**, 192–204.
 48. Ward, C., Meehan, J., Gray, M.E., Murray, A.F., Argyle, D.J., Kunkler, I.H., Langdon, S.P. (2020) The impact of tumour pH on cancer progression: strategies for clinical intervention, *Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy*, **1**, 71–100.
 49. Yamamoto, A., Huang, Y., Krajina, B.A., McBirney, M., Doak, A.E., Qu, S., Wang, C.L., Haffner, M.C., Cheung, K.J. (2023) Metastasis from the tumor interior and necrotic core formation are regulated by breast cancer-derived angiopoietin-like 7, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **120**, e2214888120.
 50. Tucker, L.H., Hamm, G.R., Sargeant, R.J.E., Goodwin, R.J.A., Mackay, C.L., Campbell, C.J., Clarke, D.J. (2019) Untargeted metabolite mapping in 3D cell culture models using high spectral resolution FT-ICR mass spectrometry imaging, *Analytical Chemistry*, **91**, 9522–9529.
 51. Zagaynova, E.V., Druzhkova, I.N., Mishina, N.M., Ignatova, N.I., Dudenkova, V.V., Shirmanova, M.V. (2017) Imaging of intracellular pH in tumor spheroids using genetically encoded sensor SypHer2, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1035**, 105–119.
 52. Kozin, S., Gerweck, L. (1998) Cytotoxicity of weak electrolytes after the adaptation of cells to low pH: role of the transmembrane pH gradient, *British Journal of Cancer*, **77**, 1580–1585.
 53. El Harane, S., Zidi, B., El Harane, N., Krause, K.H., Matthes, T., Preynat-Seauve, O. (2023) Cancer spheroids and organoids as novel tools for research and therapy: State of the art and challenges to guide precision medicine, *Cells*, **12**, 1001.
 54. Antonelli, F. (2023) 3D cell models in radiobiology: Improving the predictive value of in vitro research, *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 10620.
 55. Arutyunyan, I.V., Soboleva, A.G., Kovtunov, E.A., Kosygeva, A.M.,

- Kudelkina, V.V., Alekseeva, A.I., Elchaninov, A.V., Jumaniyazova, E.D., Goldshtein, D.V., Bolshakova, G.B. et al. (2023) Gene expression profile of 3D spheroids in comparison with 2D cell cultures and tissue strains of diffuse high-grade glioma, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **175**, 576–584.
56. L'Espérance, S., Bachvarova, M., Tetu, B., Mes-Masson, A.M., Bachvarov, D. (2008) Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids, *BMC Genomics*, **9**, 99.
57. Firuzi, O., Che, P.P., El Hassouni, B., Buijs, M., Coppola, S., Löhr, M., Funel, N., Heuchel, R., Carnevale, I., Schmidt, T. et al. (2019) Role of c-MET inhibitors in overcoming drug resistance in spheroid models of primary human pancreatic cancer and stellate cells, *Cancers (Basel)*, **11**, 638.
58. Kalluri, R., Zeisberg, M. (2006) Fibroblasts in cancer, *Nature Reviews. Cancer*, **6**, 392–401.
59. Jeong, S.Y., Lee, J.H., Shin, Y., Chung, S., Kuh, H.J. (2016) Co-culture of tumor spheroids and fibroblasts in a collagen matrix-incorporated microfluidic chip mimics reciprocal activation in solid tumor microenvironment, *PLoS One*, **11**, e0159013.
60. Ou, L., Wang, H., Huang, H., Zhou, Z., Lin, Q., Guo, Y., Mitchell, T., Huang, A.C., Karakousis, G., Schuchter, L., et al. (2022) Preclinical platforms to study therapeutic efficacy of human $\gamma\delta$ T cells, *Clinical and Translational Medicine*, **12**, e814.
61. Mittler, F., Obeid, P., Rulina, A.V., Haguët, V., Gidrol, X., Balakirev, M.Y. (2017) High-content monitoring of drug effects in a 3D spheroid model, *Frontiers in Oncology*, **7**, 293.
62. Magalhães, N.D., Liaw, L.H.L., Berns, M., Cristini, V., Chen, Z., Stupack, D., Lowengrub, J. (2010) Applications of a new In vivo tumor spheroid based shell-less chorioallantoic membrane 3-D model in bioengineering research, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, **3**, 20–26.
63. Szade, K., Zukowska, M., Szade, A., Collet, G., Kloska, D., Kieda, C., Jozkowicz, A., Dulak, J. (2015) Spheroid-plug model as a tool to study tumor development, angiogenesis, and heterogeneity in vivo, *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **37**, 2481–2496.
64. Farrell, C.L., Stewart, P.A., Del Maestro, R.F. (1987) A new glioma model in rat: the C6 spheroid implantation technique permeability and vascular characterization, *Journal of Neuro-Oncology*, **4**, 403–415.
65. Takebe, T., Imai, R., Ono, S. (2018) The current status of drug discovery and development as originated in United States academia: the influence of industrial and academic collaboration on drug discovery and development, *Clinical and Translational Science*, **11**, 597–606.
66. Zitvogel, L., Pitt, J.M., Daillyère, R., Smyth, M.J., Kroemer, G. (2016) Mouse models in oncoimmunology, *Nature Reviews. Cancer*, **16**, 759–773.
67. Ireson, C.R., Alavijeh, M.S., Palmer, A.M., Fowler, E.R., Jones, H.J. (2019) The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs, *British Journal of Cancer*, **121**, 101–108.
68. Rygaard, J., Poulsen, C.O. (1969) Heterotransplantation of a human malignant tumour to “Nude” mice, *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, **77**, 758–760.

69. Cho, S.Y., Kang, W., Han, J.Y., Min, S., Kang, J., Lee, A., Kwon, J.Y., Lee, C., Park, H. (2016). An integrative approach to precision cancer medicine using patient-derived xenografts, *Molecules and Cells*, **39**, 77–86.
70. Koga, Y., Ochiai, A. (2019) Systematic review of patient-derived xenograft models for preclinical studies of anti-cancer drugs in solid tumors, *Cells*, **8**, 418.
71. Chuprin, J., Buettner, H., Seedhom, M.O., Greiner, D.L., Keck, J.G., Ishikawa, F., Shultz, L.D., Brehm, M.A. (2023) Humanized mouse models for immuno-oncology research, *Nature Reviews. Clinical Oncology*, **20**, 192–206.
72. Walsh, N.C., Kenney, L.L., Jangalwe, S., Aryee, K.E., Greiner, D.L., Brehm, M.A., Shultz, L.D. (2017) Humanized mouse models of clinical disease, *Annual Review of Pathology*, **12**, 187–215.
73. Morton, C.L., Houghton, P.J. (2007) Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice, *Nature Protocols*, **2**, 247–250.
74. Annaratone, L., De Palma, G., Bonizzi, G., Sapino, A., Botti, G., Berriño, E., Mannelli, C., Arcella, P., Di Martino, S., Steffan, A., et al. (2021) Basic principles of biobanking: from biological samples to precision medicine for patients, *Virchows Archiv: an International Journal of Pathology*, **479**, 233–246.
75. Van Hemelryk, A., Erkens-Schulze, S., Lam, L., Stuurman, D., de Ridder, C.M.A., French, P.J., van Royen, M.E., van Weerden, W.M. (2022). Standardization of viability assays and high-content live-cell imaging protocols for large-scale drug testing in prostate cancer PDX-derived organoids, *European Journal of Cancer*, **174**, S42.
76. Küçükköse, E., Heesters, B.A., Villaudy, J., Verheem, A., Cercel, M., van Hal, S., Boj, S.F., Borel Rinkes, I.H.M., Punt, C.J.A., Roodhart, J.M.L., et al. (2022) Modeling resistance of colorectal peritoneal metastases to immune checkpoint blockade in humanized mice, *Journal for Immunotherapy of Cancer*, **10**, e005345.
77. Zhao, X., Liu, Z., Yu, L., Zhang, Y., Baxter, P., Voicu, H., Gurusiddappa, S., Luan, J., Su, J.M., Leung, H.E., et al. (2012) Global gene expression profiling confirms the molecular fidelity of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of medulloblastoma, *Neuro-Oncology*, **14**, 574–583.
78. Garrido-Laguna, I., Uson, M., Rajeshkumar, N.V., Tan, A.C., de Oliveira, E., Karikari, C., Villaroel, M.C., Salomon, A., Taylor, G., Sharma, R., et al. (2011) Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer, *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **17**, 5793–5800.
79. Dong, Y., Manley, B.J., Becerra, M.F., Redzematovic, A., Casuscelli, J., Tennenbaum, D.M., Reznik, E., Han, S., Benfante, N., Chen, Y.B., et al. (2017) Tumor xenografts of human clear cell renal cell carcinoma but not corresponding cell lines recapitulate clinical response to sunitinib: feasibility of using biopsy samples, *European Urology Focus*, **3**, 590–598.
80. Marshall, L.J., Triunfol, M., Seidle, T. (2020) Patient-derived xenograft vs. organoids: a preliminary analysis of cancer research output, funding and human health impact in 2014–2019,

- Animals: an Open Access Journal from MDPI*, **10**, 1923.
81. Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche, *Nature*, **459**, 262–265.
 82. Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G.J., van Es, J.H., van den Brink, S., van Houdt, W.J., Pronk, A., van Gorp, J., Siersema, P.D., et al. (2011) Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium, *Gastroenterology*, **141**, 1762–1772.
 83. Porter, R.J., Murray, G.I., McLean, M.H. (2020) Current concepts in tumour-derived organoids, *British Journal of Cancer*, **123**, 1209–1218.
 84. Di Baldassarre, A., Cimetta, E., Bollini, S., Gaggi, G., Ghinassi, B. (2018) Human-induced pluripotent stem cell technology and cardiomyocyte generation: progress and clinical applications, *Cells*, **25**, 48.
 85. Zhang, Y., Lu, A., Zhuang, Z., Zhang, S., Liu, S., Chen, H., Yang, X., Wang, Z. (2023) Can organoid model reveal a key role of extracellular vesicles in tumors? A comprehensive review of the literature, *International Journal of Nanomedicine*, **18**, 5511–5527.
 86. Tang, X.Y., Wu, S., Wang, D., Chu, C., Hong, Y., Tao, M., Hu, H., Xu, M., Guo, X., Liu, Y. (2022) Human organoids in basic research and clinical applications, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **7**, 168.
 87. Kondratyeva, E., Efremova, A., Melyanovskaya, Y., Voronkova, A., Polyakov, A., Bulatenko, N., Adyan, T., Sherman, V., Kovalskaia, V., Petrova, N., et al. (2022) Evaluation of the complex p.[Leu467Phe;Phe508del] CFTR allele in the intestinal organoids model: implications for therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 10377.
 88. Demchenko, A., Kondrateva, E., Tabakov, V., Efremova, A., Salikhova, D., Bukharova, T., Goldshtein, D., Balyasin, M., Bulatenko, N., Amelina, E. et al. (2022) Airway and lung organoids from human induced pluripotent stem cells can be used to assess CFTR conductance, *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 6293.
 89. Ma, X., Wang, Q., Li, G., Li, H., Xu, S., Pang, D. (2024) Cancer organoids: A platform in basic and translational research, *Genes & Diseases*, **11**, 614–632.
 90. Qian, L., Tcw, J. (2021) Human iPSC-based modeling of central nerve system disorders for drug discovery, *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, 1203.
 91. Ereemeev, A., Belikova, L., Ruchko, E., Volovikov, E., Zubkova, O., Emelin, A., Deev, R., Lebedeva, O., Bogomazova, A., Lagarkova, M. (2021) Brain organoid generation from induced pluripotent stem cells in homemade mini bioreactors, *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, **178**, 10.3791/62987.
 92. Shuel, S.L. (2022) Targeted cancer therapies: Clinical pearls for primary care, *Canadian Family Physician*, **68**, 515–518.
 93. Vanneman, M., Dranoff, G. (2012) Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment, *Nature Reviews. Cancer*, **12**, 237–251.
 94. Waldman, A.D., Fritz, J.M., Lenardo, M.J. (2020) A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice, *Nature Reviews. Immunology*, **20**, 651–668.
 95. Munagala, R., Aqil, F., Gupta, R.C. (2011) Promising molecular targeted

- therapies in breast cancer, *Indian Journal of Pharmacology*, **43**, 236–245.
96. Peng, F., Liao, M., Qin, R., Zhu, S., Peng, C., Fu, L., Chen, Y., Han, B. (2022) Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **7**, 286.
 97. Wilkes, G.M. (2018) Targeted therapy: Attacking cancer with molecular and immunological targeted agents, *Asia-Pacific Journal of Oncology Nursing*, **5**, 137–155.
 98. Ashfaq, R. (2012). Molecular profiling for personalized cancer care, *Clinical & Experimental Metastasis*, **29**, 653–655, <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9483-3>.
 99. Cheng, F., Su, L., Qian, C. (2016) Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer, *Oncotarget*, **7**, 48832–48841.
 100. Emran, T.B., Shahriar, A., Mahmud, A.R., Rahman, T., Abir, M.H., Siddiquee, Mohd. F.R., Ahmed, H., Rahman, N., Nainu, F., Wahyudin, E., et al. (2022) Multidrug resistance in cancer: understanding molecular mechanisms, immunoprevention and therapeutic approaches, *Frontiers in Oncology*, **12**, 891652.
 101. Uramoto, H., Tanaka, F. Recurrence after surgery in patients with NSCLC, *Translational Lung Cancer Research*, **3**, 242–249.
 102. Meads, M.B., Gatenby, R.A., Dalton, W.S. (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease, *Nature Reviews. Cancer*, **9**, 665–674.
 103. Sridharan, S., Macias, V., Tangella, K., Melamed, J., Dube, E., Kong, M.X., Kajdacsy-Balla, A., Popescu, G. (2016) Prediction of prostate cancer recurrence using quantitative phase imaging: Validation on a general population, *Scientific Reports*, **6**, 33818.
 104. Harada, K., Sakamoto, N. (2022) Cancer organoid applications to investigate chemotherapy resistance, *Frontiers in Molecular Biosciences*, **9**, 1067207.
 105. de Poel, E., Spelier, S., Hagemeyer, M.C., van Mourik, P., Suen, S.W.F., Vonk, A.M., Brunsveld, J.E., Ithakisiou, G.N., Kruisselbrink, E., Oppelaar, H., et al. (2023) FDA-approved drug screening in patient-derived organoids demonstrates potential of drug repurposing for rare cystic fibrosis genotypes, *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, **22**, 548–559.
 106. Wen, J., Liu, F., Cheng, Q., Weygant, N., Liang, X., Fan, F., Li, C., Zhang, L., Liu, Z. (2023) Applications of organoid technology to brain tumors, *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **29**, 2725–2743.
 107. Miserocchi, G., Spadazzi, C., Calpona, S., De Rosa, F., Usai, A., De Vita, A., Liverani, C., Cocchi, C., Vanni, S., Calabrese, C., et al. (2022) Precision medicine in head and neck cancers: Genomic and preclinical approaches, *Journal of Personalized Medicine*, **12**, 854.
 108. Yu, Y., Zhu, Y., Xiao, Z., Chen, Y., Chang, X., Liu, Y., Tang, Q., Zhang, H. (2022) The pivotal application of patient-derived organoid biobanks for personalized treatment of gastrointestinal cancers, *Biomarker Research*, **10**, 73.
 109. Chen, J., Na, F. (2022) Organoid technology and applications in lung diseases: Models, mechanism research and therapy opportunities, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **10**, 1066869.
 110. Song, T., Kong, B., Liu, R., Luo, Y., Wang, Y., Zhao, Y. (2023) Bioengineering approaches for the pan-

- creatic tumor organoids research and application, *Advanced Healthcare Materials*, e2300984.
111. Marcolin, J.C., Lichtenfels, M., da Silva, C.A., de Farias, C.B. (2023) Gynecologic and breast cancers: What's new in chemoresistance and chemosensitivity tests? *Current Problems in Cancer*, **47**, 100996.
 112. Kumar, S., Raina, M., Tankay, K., Ingle, G.M. (2023) Patient-derived organoids in ovarian cancer: Current research and its clinical relevance, *Biochemical Pharmacology*, **213**, 115589.
 113. Wang, B., Xue, Y., Zhai, W. (2022) Integration of tumor microenvironment in patient-derived organoid models help define precision medicine of renal cell carcinoma, *Frontiers in Immunology*, **13**, 902060.
 114. Medle, B., Sjö Dahl, G., Eriksson, P., Liedberg, F., Höglund, M., Bernardo, C. (2022) Patient-derived bladder cancer organoid models in tumor biology and drug testing: A systematic review, *Cancers (Basel)*, **14**, 2062.
 115. Pamarthy, S., Sabaawy, H.E. (2021) Patient derived organoids in prostate cancer: improving therapeutic efficacy in precision medicine, *Molecular Cancer*, **20**, 125.
 116. Zhu, J., Ji, L., Chen, Y., Li, H., Huang, M., Dai, Z., Wang, J., Xiang, D., Fu, G., Lei, Z., et al. (2023) Organoids and organs-on-chips: insights into predicting the efficacy of systemic treatment in colorectal cancer, *Cell Death Discovery*, **9**, 72.
 117. Xu, S., Tan, S., Guo, L. (2023) Patient-derived organoids as a promising tool for multimodal management of sarcomas, *Cancers (Basel)*, **15**, 4339.
 118. Wuputra, K., Ku, C.C., Kato, K., Wu, D.C., Saito, S., Yokoyama, K.K. (2021) Translational models of 3-D organoids and cancer stem cells in gastric cancer research, *Stem Cell Research & Therapy*, **12**, 492.
 119. Wuputra, K., Ku, C.C., Wu, D.C., Lin, Y.C., Saito, S., Yokoyama, K.K. (2020) Prevention of tumor risk associated with the reprogramming of human pluripotent stem cells, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **39**, 100.
 120. Hepburn, A.C., Steele, R.E., Veeraterapillay, R., Wilson, L., Kounatidou, E.E., Barnard, A., Berry, P., Cassidy, J.R., Moad, M., El-Sherif, A., et al. (2019) The induction of core pluripotency master regulators in cancers defines poor clinical outcomes and treatment resistance, *Oncogene*, **38**, 4412–4424.
 121. Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663–676.
 122. Fernandez, T. de S., de Souza Fernandez, C., Mencialha, A.L. (2013) Human induced pluripotent stem cells from basic research to potential clinical applications in cancer, *BioMed Research International*, **2013**, 430290.
 123. Kastner, C., Hendricks, A., Deinklein, H., Hankir, M., Germer, C.T., Schmidt, S., Wiegner, A. (2021) Organoid models for cancer research – From bed to bench side and back, *Cancers (Basel)*, **13**, 4812.
 124. Vivarelli, S., Candido, S., Caruso, G., Falzone, L., Libra, M. (2020) Patient-derived tumor organoids for drug repositioning in cancer care: A promising approach in the era of tailored treatment, *Cancers (Basel)*, **12**, 3636.
 125. Yang, C., Xia, B.R., Jin, W.L., Lou, G. (2019) Circulating tumor cells in precision oncology: clinical applications in liquid biopsy and 3D organoid model, *Cancer Cell International*, **19**, 341.

126. Wang, T., Tang, Y., Pan, W., Yan, B., Hao, Y., Zeng, Y., Chen, Z., Lan, J., Zhao, S., Deng, C., et al. (2023) Patient-derived tumor organoids can predict the progression-free survival of patients with stage IV colorectal cancer after surgery, *Diseases of the Colon and Rectum*, **66**, 733–743.
127. Bergin, C.J., Benoit, Y.D. (2022) Protocol for serial organoid formation assay using primary colorectal cancer tissues to evaluate cancer stem cell activity, *STAR Protocols*, **3**, 101218.
128. Urbischek, M., Rannikmae, H., Foets, T., Ravn, K., Hyvönen, M., de la Roche, M. (2019) Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity, *Scientific Reports*, **9**, 6193.
129. Yin, X., Mead, B.E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J.M., Levy, O. (2016) Engineering stem cell organoids, *Cell Stem Cell*, **18**, 25–38.
130. Anderson, N.M., Simon, M.C. (2020) The tumor microenvironment, *Current Biology*, **30**, 921–925.
131. Hutchinson, L., Kirk, R. (2011) High drug attrition rates – where are we going wrong? *Nature Reviews Clinical Oncology*, **8**, 189–190.
132. Jin, M.Z., Jin, W.L. (2020) The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5**, 166.
133. Visalakshan, R.M., Lowrey, M.K., Sousa, M.G.C., Helms, H.R., Samiea, A., Schutt, C.E., Moreau, J.M., Bertassoni, L.E. (2023) Opportunities and challenges to engineer 3D models of tumor-adaptive immune interactions, *Frontiers in Immunology*, **14**, 1162905.
134. Feder-Mengus, C., Ghosh, S., Reschner, A., Martin, I., Spagnoli, G.C. (2008). New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? *Trends in Molecular Medicine*, **14**, 333–340.
135. Cham, C.M., Gajewski, T.F. (2005). Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8⁺ effector T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **174**, 4670–4677.
136. Gottfried, E., Kunz-Schughart, L.A., Ebner, S., Mueller-Klieser, W., Hoves, S., Andreesen, R., Mackensen, A., Kreutz, M. (2006). Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression, *Blood*, **107**, 2013–2021.
137. Clinton, J., McWilliams-Koepfen, P. (2018) Initiation, expansion, and cryopreservation of human primary tissue-derived normal and diseased organoids in embedded three-dimensional culture, *Current Protocols in Cell Biology*, **82**, e66.
138. Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., et al. (2007) The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression, *Molecular Oncology*, **1**, 84–96.
139. Xu, X., Gurski, L.A., Zhang, C., Harrington, D.A., Farach-Carson, M.C., Jia, X. (2012) Recreating the tumor microenvironment in a bilayer, hyaluronic acid hydrogel construct for the growth of prostate cancer spheroids, *Biomaterials*, **33**, 9049–9060.
140. Sieh, S., Lubik, A.A., Clements, J.A., Nelson, C.C., Hutmacher, D.W. (2010) Interactions between human osteoblasts and prostate cancer cells in a novel 3D in vitro model, *Organogenesis*, **6**, 181–188.
141. Hutmacher, D.W., Loessner, D., Rizzi, S., Kaplan, D.L., Mooney, D.J., Clements, J.A. (2010) Can

- tissue engineering concepts advance tumor biology research? *Trends in Biotechnology*, **28**, 125–133.
142. Sell, S.A., Wolfe, P.S., Garg, K., McCool, J.M., Rodriguez, I.A., Bowlin, G.L. (2010) The use of natural polymers in tissue engineering: A focus on electrospun extracellular matrix analogues, *Polymers*, **2**, 522–553.
143. Giraud, M.V., Di Francesco, D., Catoira, M.C., Cotella, D., Fusaro, L., Boccafoschi, F. (2020) Angiogenic potential in biological hydrogels, *Biomedicines*, **8**, 436.
144. Le Bao, C., Waller, H., Dellaquila, A., Peters, D., Lakey, J., Chaubet, F., Simon-Yarza, T. (2022) Spatial-controlled coating of pro-angiogenic proteins on 3D porous hydrogels guides endothelial cell behavior, *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 14604.
145. Roudsari, L.C., Jeffs, S.E., Witt, A.S., Gill, B.J., West, J.L. (2016) A 3D poly(ethylene glycol)-based tumor angiogenesis model to study the influence of vascular cells on lung tumor cell behavior, *Scientific Reports*, **6**, 32726.
146. Trujillo-de Santiago, G., Flores-Garza, B.G., Tavares-Negrete, J.A., Lara-Mayorga, I.M., González-Gamboa, I., Zhang, Y.S., Rojas-Martínez, A., Ortiz-López, R., Álvarez, M.M. (2019) The tumor-on-chip: recent advances in the development of microfluidic systems to recapitulate the physiology of solid tumors, *Materials (Basel, Switzerland)*, **12**, 2945.
147. Shin, K. (2022) Stem cells, organoids and their applications for human diseases: Special issue of BMB Reports in 2023, *BMB Reports*, **56**, 1.
148. Wei, Y., Amend, B., Todenhöfer, T., Lipke, N., Aicher, W.K., Fend, F., Stenzl, A., Harland, N. (2022) Urinary tract tumor organoids reveal eminent differences in drug sensitivities when compared to 2-dimensional culture systems, *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 6305.
149. Mo, S., Tang, P., Luo, W., Zhang, L., Li, Y., Hu, X., Ma, X., Chen, Y., Bao, Y., He, X., et al. (2022) Patient-derived organoids from colorectal cancer with paired liver metastasis reveal tumor heterogeneity and predict response to chemotherapy, *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, **9**, e2204097.
150. Yan, H.H.N., Siu, H.C., Law, S., Ho, S.L., Yue, S.S.K., Tsui, W.Y., Chan, D., Chan, A.S., Ma, S., Lam, K.O., et al. (2018) A comprehensive human gastric cancer organoid biobank captures tumor subtype heterogeneity and enables therapeutic screening, *Cell Stem Cell*, **23**, 882–897.e11.
151. Li, X., Francies, H.E., Secrier, M., Perner, J., Miremadi, A., Galeano-Dalmau, N., Barendt, W.J., Letchford, L., Leyden, G.M., Goffin, E.K., et al. (2018) Organoid cultures recapitulate esophageal adenocarcinoma heterogeneity providing a model for clonality studies and precision therapeutics, *Nature Communications*, **9**, 2983.
152. Yao, Y., Xu, X., Yang, L., Zhu, J., Wan, J., Shen, L., Xia, F., Fu, G., Deng, Y., Pan, M., et al. (2020) Patient-derived organoids predict chemoradiation responses of locally advanced rectal cancer, *Cell Stem Cell*, **26**, 17–26.e6.
153. Porcelli, L., Di Fonte, R., Pierri, C.L., Fucci, L., Saponaro, C., Armenio, A., Serrati, S., Strippoli, S., Fasano, R., Volpicella, M., et al. (2022) BRAF^{V600E;K601Q} metastatic melanoma patient-derived organoids and docking analysis to predict the response to targeted

- therapy, *Pharmacological Research*, **182**, 106323.
154. Keles, H., Schofield, C.A., Ran-
nikmae, H., Edwards, E.E., Mo-
hamet, L. (2022) A scalable 3D
high-content imaging protocol for
measuring a drug induced DNA
damage response using immu-
nofluorescent subnuclear γ H2AX
spots in patient derived ovarian
cancer organoids, *ACS Pharma-
cology & Translational Science*, **6**,
12–21.
 155. Wang, T., Pan, W., Zheng, H.,
Zheng, H., Wang, Z., Li, J.J., Deng,
C., Yan, J. (2021). Accuracy of
using a patient-derived tumor orga-
noid culture model to predict the
response to chemotherapy regimens
in stage IV colorectal cancer: A
blinded study, *Diseases of the Col-
on and Rectum*, **64**, 833–850.
 156. Narasimhan, V., Wright, J.A., Chur-
chill, M., Wang, T., Rosati, R.,
Lannagan, T.R.M., Vrbanac, L.,
Richardson, A.B., Kobayashi, H.,
Price, T., et al. (2020) Medium-
throughput drug screening of pa-
tient-derived organoids from colo-
rectal peritoneal metastases to
direct personalized therapy, *Clini-
cal Cancer Research: an Official
Journal of the American Asso-
ciation for Cancer Research*, **26**,
3662–3670.
 157. Ooft S.N., Weeber F., Schipper
L., Dijkstra K.K., McLean C.M.,
Kaing S., et al. (2021). Prospective
experimental treatment of colorectal
cancer patients based on organoid
drug responses, *ESMO Open*, **6**,
100103.
 158. Magré, L., Versteegen, M.M.A.,
Buschow, S., van der Laan, L.J.W.,
Peppelenbosch, M., Desai, J. (2023)
Emerging organoid-immune co-
culture models for cancer research:
from oncoimmunology to perso-
nalized immunotherapies, *Journal
for ImmunoTherapy of Cancer*, **11**,
e006290.
 159. Gezgin, G., Visser, M., Ruano,
D., Santegoets, S.J., de Miranda,
N.F.C.C., van der Velden, P.A.,
Luyten, G.P.M., van der Burg, S.H.,
Verdegaal, E.M., Jager, M.J. (2022)
Tumor-infiltrating T cells can be
expanded successfully from primary
uveal melanoma after separation
from their tumor environment, *Oph-
thalmology Science*, **2**, 100132.
 160. Zhou, G., Lieshout, R., van Tien-
deren, G.S., de Ruiter, V., van Roy-
en, M.E., Boor, P.P.C., Magré, L.,
Desai, J., Köten, K., Kan, Y.Y.,
et al. (2022) Modelling immune
cytotoxicity for cholangiocarcinoma
with tumour-derived organoids and
effector T cells, *British Journal of
Cancer*, **127**, 649–660.
 161. Zhang, W., Zheng, X. (2023) Patient-
derived xenografts or organoids
in the discovery of traditional and
self-assembled drug for tumor im-
munotherapy, *Frontiers in Onco-
logy*, **13**, 1122322.
 162. Singh, N., Maus, M.V. (2023) Syn-
thetic manipulation of the cancer-
immunity cycle: CAR-T cell the-
rapy, *Immunity*, **56**, 2296–2310.
 163. Hemminki, O., dos Santos, J.M.,
Hemminki, A. (2020) Oncolytic
viruses for cancer immunotherapy,
*Journal of Hematology & Onco-
logy*, **13**, 84.
 164. Song, Q., Zhang, C., Wu, X. (2018)
Therapeutic cancer vaccines: From
initial findings to prospects, *Immu-
nology Letters*, **196**, 11–21.
 165. Sun, Q., Hong, Z., Zhang, C., Wang,
L., Han, Z., Ma, D. (2023) Immune
checkpoint therapy for solid tu-
mours: clinical dilemmas and future
trends, *Signal Transduction and
Targeted Therapy*, **8**, 320.
 166. Leach, D.R., Krummel, M.F., Al-
lison, J.P. (1996) Enhancement of
antitumor immunity by CTLA-4
blockade, *Science (New York, N.Y.)*,
271, 1734–1736.

167. Pham, T.N.D., Shields, M.A., Spaulding, C., Principe, D.R., Li, B., Underwood, P.W., Trevino, J.G., Bentrem, D.J., Munshi, H.G. (2021) Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma and their utility in immunotherapy studies, *Cancers (Basel)*, **13**, 440.
168. Guo, L., Wei, R., Lin, Y., Kwok, H.F. (2020) Clinical and recent patents applications of PD-1/PD-L1 targeting immunotherapy in cancer treatment—current progress, strategy, and future perspective, *Frontiers in Immunology*, **11**, 1508.
169. Dong, Y., Wong, J.S.L., Sugimura, R., Lam, K.O., Li, B., Kwok, G.G.W., Leung, R., Chiu, J.W.Y., Cheung, T.T., Yau, T. (2021) Recent advances and future prospects in immune checkpoint (ICI)-based combination therapy for advanced HCC, *Cancers (Basel)*, **13**, 1949.
170. Ou, L., Liu, S., Wang, H., Guo, Y., Guan, L., Shen, L., Luo, R., Elder, D.E., Huang, A.C., Karakousis, G., et al. (2023) Patient-derived melanoma organoid models facilitate the assessment of immunotherapies, *eBioMedicine*, **92**, 104614.
171. Murali, A.K., Mehrotra, S. (2011). Apoptosis – an ubiquitous T cell immunomodulator, *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, **S3**, 2.
172. Courau, T., Bonnereau, J., Chicoteau, J., Bottois, H., Remark, R., Assante Miranda, L., Toubert, A., Blery, M., Aparicio, T., Allez, M., Le Bourhis, L. (2019). Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment, *Journal for Immunotherapy of Cancer*, **7**, 74.
173. Bogomiakova, M.E., Sekretova, E.K., Ereemeev, A.V., Shuvalova, L.D., Bobrovsky, P.A., Zerkalenkova, E.A., Lebedeva, O.S., Lagarkova, M.A. (2021). Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPCMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing, *Stem cell research*, **55**, 102451.
174. Norouzi-Barough, L., Sarookhani, M.R., Salehi, R., Sharifi, M., Moghbelinejad, S. (2018) CRISPR/Cas9, a new approach to successful knock-down of ABCB1/P-glycoprotein and reversal of chemosensitivity in human epithelial ovarian cancer cell line, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, **21**, 181–187.
175. Liu, T., Li, Z., Zhang, Q., Bernstein, K.D.A., Lozano-Calderon, S., Choy, E., Hornicek, F.J., Duan, Z. (2016) Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance, *Oncotarget*, **7**, 83502–83513.
176. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Church, G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science (New York, N.Y.)*, **339**, 823–826.
177. Geurts, M.H., Clevers, H. (2023) CRISPR engineering in organoids for gene repair and disease modeling, *Nature Reviews Bioengineering*, **1**, 32–45.
178. Wang, H., Nakamura, M., Abbott, T.R., Zhao, D., Luo, K., Yu, C., Nguyen, C.M., Lo, A., Daley, T.P., La Russa, M., et al. (2019) CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription, *Science (New York, N.Y.)*, **365**, 1301–1305.
179. Hendriks, D., Artegiani, B., Hu, H., Chuva de Sousa Lopes, S., Clevers, H. (2020) Establishment of human fetal hepatocyte organoids and CRISPR–Cas9-based gene knockin and knockout in organoid cultures from human liver, *Nature Protocols*, **16**, 182–217.

180. Maloshenok, L.G., Abushinova, G.A., Ryazanova, A.Yu., Bruskin, S.A., Zherdeva, V.V. (2023) Visualizing the nucleome using the CRISPR–Cas9 system: From *in vitro* to *in vivo*, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, S123–S149.
181. DiMasi, J.A., Reichert, J.M., Feldman, L., Malins, A. (2013) Clinical approval success rates for investigational cancer drugs, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **94**, 329–335.
182. Романовский, Г.Б. (2020) Правовая политика в сфере персонализированной медицины, *электронный научный журнал «Наука. Общество. Государство»*, **8**, doi:10.21685/2307-9525-2020-8-1-7.