DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-100-115

BY 4.0

Экспериментальное тестирование химиорезистентности опухолевых клеток рака яичников

К.А. Кузин[1], Т.И. Фетисов[1, 2], О.А. Власова[1], Р.И. Князев[1, 3], Е.Е. Антошина[1], Л.С. Труханова[1], Т.Г. Горькова[1], Г.А. Белицкий[1], М.Г. Якубовская[1, 2], К.И. Кирсанов[1, 2]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;
[3]ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 123995 Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Контакты: Константин Александрович Кузин *kuzin_konstantin@mail.ru*

Одной из наиболее сложных проблем в лечении больных раком яичников является высокий уровень химиорезистентности опухолевых клеток, что обусловливает раннее развитие рецидива заболевания и низкие показатели общей выживаемости. В случае химиорезистентности терапия оказывается неэффективной, вызывает неоправданный расход лекарственных препаратов, наносит ущерб пациенту из-за развития побочных токсических эффектов и временных потерь на ее проведение. Одним из подходов к решению этой проблемы является экспериментальное предиктивное тестирование химиорезистентности опухолевых клеток *in vitro*.

Цель исследования – разработка протокола экспериментального тестирования химиорезистентности клеток рака яичников к химиотерапевтическим препаратам.

Мы проанализировали изменение количества жизнеспособных клеток линий A-1847, Ovcar-3 и Ovcar-4 при их культивировании в гипоадгезионных условиях и оптимизировали метод определения жизнеспособности клеток по метаболизму резазурина. Выявлено, что жизнеспособность клеток рака яичников исследуемых линий в присутствии препаратов 1-й и 2-й линий противоопухолевой терапии, измеренная в соответствии с разработанным протоколом культивирования в гипоадгезионных условиях с использованием набора ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия), одобренного для применения в клинической практике в Германии, находится примерно на одном уровне. Разработанная методика основана на использовании доступных и недорогих реагентов и расходных материалов, что делает ее экономически привлекательной.

Ключевые слова: рак яичников, резистентность, тест на индивидуальную резистентность к химиотерапии, линии опухолевых клеток рака яичников, резазуриновый тест на жизнеспособность клеток

Для цитирования: Кузин К.А., Фетисов Т.И., Власова О.А. и др. Экспериментальное тестирование химиорезистентности опухолевых клеток рака яичников. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):100–15.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-100-115

Experimental testing of chemoresistance of ovarian cancer tumor cells

K.A. Kuzin[1], T.I. Fetisov[1, 2], O.A. Vlasova[1], R.I. Knyazev[1, 3], E.E. Antoshina[1], L.S. Trukhanova[1], T.G. Gor'kova[1], G.A. Belitsky[1], M.G. Yakubovskaya[1, 2], K.I. Kirsanov[1, 2]

[1]N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;
[2]Peoples' Friendship University of Russia; Universtiy; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;
[3]Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; 2/1 Barricadnaya St., 123995 Moscow, Russia

Contacts: Konstantin Alexandrovich Kuzin *kuzin_konstantin@mail.ru*

One of the most challenging issues in the treatment of ovarian cancer is the high level of tumor cell chemoresistance, which leads to early tumor recurrence and low overall survival. In the case of tumor cell chemoresistance, the therapy is ineffective, resulting in unnecessary drug consumption and harm to the patient due to toxic side effects and time losses

during its implementation. One approach to solving this problem is experimental predictive testing of tumor cell chemoresistance *in vitro*.

Aim. To develop a protocol of experimental testing of chemoresistance of ovarian cancer cells to chemotherapy drugs.

We analyzed changes in the number of viable cells of A-1847, Ovcar-3 and Ovcar-4 cell lines cultured in hypo-adhesive conditions and optimized a method of cell viability determination based on resazurin metabolism. It was shown that viability of ovarian cancer cells of the studied cell lines is approximately the same in the presence of 1st and 2nd line antitumor drugs measured in accordance with the developed culture protocol in hypo-adhesive conditions and using ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) approved for use in clinical practice. The developed method is based on readily available and inexpensive reagents and expendables which makes it economically attractive.

Keywords: ovarian cancer, resistance, individual resistance to chemotherapy test, ovarian cancer cell lines, resazurin cell viability assay

For citation: Kuzin K.A., Fetisov T.I., Vlasova O.A. et al. Experimental testing of chemoresistance of ovarian cancer tumor cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(3):100–15. (In Russ.).
DOI: doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-100-115

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные эпителиальные опухоли яичников – гетерогенная группа новообразований, занимающая одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности [1]. Общая 5-летняя выживаемость при данной патологии составляет около 50 % [2].

Современные подходы к лечению больных с вновь выявленным раком яичников (РЯ) включают циторедуктивное хирургическое вмешательство, как правило в сочетании с платиносодержащей химиотерапией (ХТ) [3, 4]. Рецидив заболевания после первичного лечения развивается у 70–80 % пациенток [5]. Тактика лечения больных с рецидивами зависит от времени, прошедшего от момента окончания курса ХТ 1-й линии до возникновения рецидива. Как правило, повторно назначают ХТ. При этом у 10–40 % пациенток с вновь выявленным РЯ платиносодержащая ХТ изначально неэффективна [6, 7]. В случае развития рецидива РЯ эффективность терапии не превышает 66 % [8].

В соответствии с современными клиническими рекомендациями эффективность лекарственного лечения злокачественных опухолей оценивают по результатам объективного обследования пациента после проведения ХТ [9]. На сегодняшний день предложен ряд методик, позволяющих предсказывать результаты лечения до его начала на основании данных молекулярно-генетических анализов или экспериментального тестирования резистентности/чувствительности клеток опухоли к лекарственному препарату [10–12].

Первоначально экспериментальные предиктивные тесты были направлены на определение индивидуальной чувствительности опухолевых клеток к цитостатикам с целью выбора наиболее эффективного препарата для ХТ, однако оказалось, что выявление резистентности опухоли имеет более высокую прогностическую значимость, чем чувствительности [13]. Это связывают с гетерогенностью опухоли и возможностью существования резистентного клона опухолевых клеток вне взятого для анализа образца опухолевой ткани, а также с влиянием на метаболизм противоопухолевого препарата микроокружения и в целом организма.

Возможность использования экспериментального тестирования при выборе препаратов для проведения 2-й и 3-й линий ХТ при РЯ в настоящее время остается предметом активных научных изысканий [14]. Целесообразность подобных исследований обусловлена неэффективным расходованием дорогостоящих противоопухолевых препаратов в случае химиорезистентности опухолевых клеток и неоправданным ущербом, наносимым организму пациента высокотоксичными цитостатиками при наличии изначальной резистентности опухоли к ним.

Наиболее распространенный подход к экспериментальному определению резистентности клеток опухоли пациента к химиотерапевтическому препарату основан на использовании так называемых CSR-тестов (Chemotherapy Sensitivity and Resistance assays). Существует множество различных видов CSR-тестов, и в ряде стран некоторые из них используют в клинической практике для предиктивного определения резистентности опухолевых клеток к препарату [8, 15, 16]. В частности, в Германии для определения химиорезистентности клеток РЯ в клинической практике используют набор ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) [17]. В Российской Федерации в настоящее время наборы для экспериментального определения резистентности опухолевых клеток конкретного пациента к химиопрепаратам не зарегистрированы.

С учетом вышеизложенного разработка новых экспериментальных методик определения резистентности клеток опухоли у пациентов с РЯ является актуальной задачей.

Цель исследования – разработка экспериментальной методики определения резистентности опухолевых клеток РЯ к химиотерапевтическим препаратам.

Для решения этой цели поставлены следующие задачи:

1) выбрать гипоадгезионные условия культивирования клеток РЯ, способствующих формированию сфероидов;
2) определить изменение количества жизнеспособных клеток РЯ в течение первых 6 дней культивирования в гипоадгезионных условиях;
3) определить оптимальные условия выполнения теста на жизнеспособность клеток по метаболизму резазурина;
4) сравнить результаты определения резистентности клеток линий РЯ, получаемых с использованием разработанной методики и набора ATP-TCA;
5) проанализировать дозовые зависимости к химиопрепаратам при использовании разработанного протокола тестирования в отношении опухолевых клеток пациенток с РЯ, получавших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опухолевые клетки. В исследовании использовали линии клеток РЯ A-1847, Ovcar-3 и Ovcar-4, предоставленные профессором Р.Г. Киямовой (Казанский (Приволжский) федеральный университет), а также первичные культуры клеток, полученные из образцов опухолевой ткани и асцитической жидкости пациенток с серозной аденокарциномой яичников III–IV стадии, получавших лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина.

Культивирование клеток в стандартных условиях. Клетки культивировали во флаконах 75 см^2 (Eppendorf, Германия) в среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л («ПанЭко», Россия), добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10 %) (Biosera, Франция), смеси антибиотиков пенициллина (50 ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия), L-глутамина (2 мМ) («ПанЭко», Россия) в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2). Пассирование клеток проводили по достижении ими уровня конфлюентности 80–90 %.

Культивирование клеток в гипоадгезионных условиях. Культивирование в гипоадгезионных условиях осуществляли в количестве 20 000 клеток на образец следующими способами: 1) в 200 мкл бессывороточной среды, приготовленной на основе DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л с 25 мМ HEPES и без него («ПанЭко», Россия), альбумина человеческого (0,4 %) (Baxter AG, Австрия), инсулин-трансферрин-селенита (инсулин – 0–10 мкг/мл, трансферрин – 0–5,5 мкг/мл, селенит натрия – 0–6,7 нг/мл) («ПанЭко», Россия), смеси антибиотиков пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия), L-глутамина (2 мМ) («ПанЭко», Россия) в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Corning, США); 2) в 200 мкл бессывороточной среды Complete Assay Medium (CAM) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) в низкоадгезионных 96-луночных полипропиленовых планшетах, входящих в состав набора ATP-TCA.

Получение сфероидов и их гистологический анализ. Для гистологического исследования опухолевые клетки культивировали в гипоадгезионных условиях с использованием бессывороточной среды на основе DMEM с содержанием 4,5 г/л глюкозы с HEPES, 0,4 % альбумина человеческого (Baxter AG, Австрия), инсулин-трансферрин-селенита (инсулин – 10 мкг/мл, трансферрин – 5,5 мкг/мл, селенит натрия – 6,7 нг/мл) («ПанЭко», Россия), смеси антибиотиков пенициллина (50 ед/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) («ПанЭко», Россия), L-глутамина (2 мМ) («ПанЭко», Россия), которая далее указана как бессывороточная среда для тестирования резистентности 3 (БСТР3), в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Corning, США). Сформировавшиеся при культивировании 3D-структуры (сфероиды) после осаждения центрифугированием при 150 g в течение 5 мин, фиксировали в 70 % этиловом спирте и помещали в агарозный гель, используя агарозу с низкой температурой плавления (Bio-Rad, США). Фрагменты агарозного геля, содержащие клеточные структуры, обезвоживали в течение 3 сут с применением серии спиртов восходящей концентрации (70°, 96°, 100°), а затем хлороформа. Парафиновые блоки получали с использованием среды Histomix (BioVitrum, Россия). Серийные срезы (5 мкм) депарафинизировали, окрашивали гематоксилином Майера (BioVitrum, Россия) и водно-спиртовым эозином (BioVitrum, Россия) и заключали в монтирующую среду (Bio-Optica, Италия) для выполнения гистологического и цитологического исследований. Анализ гистологических препаратов и фотографирование изображений проводили с использованием микроскопа Olympus CX31 (Olympus, Япония) (x40), оснащенного цифровой камерой Olympus SC50 (Olympus, Япония).

Определение количества жизнеспособных клеток. Количество жизнеспособных клеток определяли с использованием 3 подходов: 1) выявляли нарушения целостности клеточной мембраны с помощью окрашивания трипановым синим; 2) оценивали активность метаболизма клетками резазурина; 3) определяли внутриклеточный уровень аденозинтрифосфата (АТФ).

Определение количества жизнеспособных клеток с использованием окрашивания трипановым синим. Суспензию клеток и сфероидов переносили в пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл раствора Версена («ПанЭко», Россия), после повторного центрифугирования ресуспендировали осадок в 50 мкл 0,05 % раствора трипсина-ЭДТА (ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота) («ПанЭко», Россия) и инкубировали при 37 °C в течение 5 мин. После 3-го центрифугирования осадок ресуспендировали в 200 мкл среды DMEM с содержанием 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия). Суспензию клеток смешивали

в соотношении 10:1 с 0,4 % раствором трипанового синего (Gibco, США) и помещали в камеру Горяева.

Прямой подсчет клеток и расчет их концентрации, а также процентного содержания жизнеспособных (неокрашенных) и погибших (окрашенных) клеток проводили с использованием микроскопа Nikon Eclipse TS 100 (Nikon, Япония) (×40).

Оценка жизнеспособности клеток по метаболизму резазурина. К 200 мкл среды культивирования клеток добавляли 20 мкл раствора резазурина (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 180 мкг/мл. После инкубации с резазурином в течение 4–16 ч переносили 150 мкл культуральной среды каждого из образцов в черный 96-луночный планшет (SPL Life Sciences, Корея) и измеряли уровень флуоресценции резоруфина (продукт метаболизма резазурина с длиной волны возбуждения – 560 нм, эмиссии – 590 нм) с помощью планшетного флуориметра SpectraMax M3 (Molecular Devices, США).

Оценка жизнеспособности клеток по уровню АТФ. Для определения внутриклеточного уровня АТФ к 200 мкл среды культивирования добавляли 50 мкл реагента для лизиса опухолевых клеток (Tumor Cell Extraction Reagent, DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем 50 мкл лизата переносили в белый 96-луночный планшет (Costar, США) и после добавления 50 мкл люциферин-люциферазного реагента (Luciferin-Luciferase Reagent, DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия), предварительно разведенного согласно инструкции производителя в буфере для разведения (Dilution Buffer, DCS Innovative Diagnostik-ysteme, Германия), измеряли уровень люминесценции с использованием люминометра Berthold Orion II (Berthold, Германия).

Получение первичных культур опухолевых клеток злокачественных новообразований яичников. Первичные культуры опухолевых клеток от пациенток с РЯ получали из образцов асцитической жидкости и опухолевой ткани. Клетки асцитической жидкости осаждали с использованием центрифуги Hettich Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Германия) при 150 g в течение 5 мин. Для удаления эритроцитов клеточный осадок инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в 5 мл лизис-буфера ACK (Gibco, США), содержащего 155 мМ NH_4Cl, 10 мМ $KHCO_3$ и 0,1 мМ ЭДТА. Клетки дважды осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде DMEM с содержанием 4,5 г/л глюкозы. Образец опухолевой ткани измельчали механически до кусочков размером в 1 мм^3, помещали в 10 мл раствора коллагеназы А (1 мг/мл) в бессывороточной среде и инкубировали на шейкере-инкубаторе Heidolph Unimax 1010 (Heidolph Instruments, Германия) при температуре 37 °С в течение 2,5–6 ч. Для удаления эритроцитов из образца использовали методику, описанную выше. Клетки дважды осаждали центрифугированием с последующим ресуспендированием в среде DMEM с содержанием 4,5 г/л глюкозы.

Обработка клеток цитостатиками. Обработку клеток цитостатиками проводили в гипоадгезионных условиях, добавляя в среду культивирования противоопухолевые препараты: цисплатин (Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Россия), паклитаксел (Teva, Израиль), доксорубицин (Pfizer, Италия). Клетки культивировали в присутствии 6 концентраций цитостатиков, составляющих 200; 100; 50; 25; 12,5 и 6,25 % тестовой концентрации препарата (test drug concentration, TDC). В качестве TDC использовали следующие концентрации препаратов: для цисплатина – 3,8 мкг/мл, для паклитаксела – 13,6 мкг/мл, для доксорубицина – 0,5 мкг/мл.

Определение резистентности клеток линий рака яичников и первичных культур. Клетки линий РЯ и первичных культур злокачественных новообразований яичников после обработки цитостатиками культивировали в гипоадгезионных условиях. На 5-й день в бессывороточную среду культивирования БСТР3 добавляли раствор резазурина в концентрации 180 мкг/мл и определяли жизнеспособность клеток через 16 ч по уровню флуоресценции резоруфина, или на 6-й день в среду культивирования САМ добавляли 50 мкл реагента для лизиса опухолевых клеток и определяли жизнеспособность клеток по уровню АТФ.

В качестве показателя подавления роста опухоли (tumor growth inhibition, TGI) использовали соотношение уровней жизнеспособности клеток в присутствии 1 из 6 концентраций цитостатика и без добавления цитостатика, рассчитываемое по формуле:

$$TGI_{\%\ TDC} = [1 - (I_{\%\ TDC} - I_0) / (I_{TDC0} - I_0)] \times 100\ \%,$$

где $TGI_{\%\ TDC}$ – подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей указанному проценту от TDC; $I_{\%\ TDC}$ – средний показатель интенсивности флуоресценции/люминесценции в образце при культивировании клеток в соответствующей концентрации цитостатика; I_{TDC0} – средний показатель интенсивности флуоресценции/люминесценции в образце при культивировании клеток без препаратов; I_0 – средний показатель интенсивности флуоресценции/люминесценции в образце культуральной среды.

Индекс резистентности/чувствительности (RSI) рассчитывали по формуле:

$$RSI = 600 - \Sigma (TGI_{6,25\ \%\ TDC} + TGI_{12,5\ \%\ TDC} + TGI_{25\ \%\ TDC} + TGI_{50\ \%\ TDC} + TGI_{100\ \%\ TDC} + TGI_{200\ \%\ TDC}),$$

где RSI – индекс резистентности/чувствительности; $TGI_{6,25\ \%\ TDC}$ – подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 6,25 % TDC; $TGI_{12,5\ \%\ TDC}$ – подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации

цитостатика, соответствующей 12,5 % TDC; $TGI_{25\ \%\ TDC}$ – подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 25 % TDC; $TGI_{50\ \%\ TDC}$ – подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 50 % TDC; $TGI_{100\ \%\ TDC}$ – подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 100 % TDC; $TGI_{200\ \%\ TDC}$ – подавление роста опухоли при культивировании клеток в концентрации цитостатика, соответствующей 200 % TDC.

Статистическая обработка полученных данных. Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.4.3. Статистическую значимость различий интенсивности флуоресценции между образцами с различным количеством жизнеспособных клеток оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-тестом Тьюки. Статистическую значимость различий RSI рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия для всех методов считались статистически значимыми при $p < 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование 3D-структур клетками рака яичников при культивировании в гипоадгезионных условиях. Прототипом разрабатываемой методики экспериментального определения индивидуальной резистентности опухолей пациенток со злокачественными новообразованиями яичников к противоопухолевым препаратам послужил используемый в настоящее время в клинической практике набор реагентов и расходных материалов ATP-TCA (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия). Методика, используемая в ATP-TCA, предполагает культивирование опухолевых клеток, полученных из биологических образцов больных в количестве 15 000–25 000 в лунке в течение 6 дней в 6 последовательно понижающихся концентрациях цитостатического агента (200; 100; 50; 25; 12,5 и 6,25 % TDC). TDC, применяемые в этом тесте, воспроизводят максимальные концентрации препаратов, определяемые в плазме пациенток при проведении курсов ХТ [18]. Культивирование клеток в ходе теста ATP-TCA осуществляют в гипоадгезионных условиях с применением бессывороточной среды CAM и низкоадгезионных 96-луночных полипропиленовых планшетов (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия), что, благодаря неспособности ряда нормальных клеток выживать в подобных условиях, обеспечивает увеличение доли опухолевых клеток и, соответственно, возможность более объективно оценивать резистентность/чувствительность именно злокачественных клеток [19]. Использование гипоадгезионных условий при культивировании способствует образованию из злокачественных эпителиальных клеток 3D-структур, в частности сфероидов, резистентность/чувствительность которых более объективно отражает резистентность/чувствительность опухоли в организме, чем при использовании 2D-монослойных культур злокачественных клеток [20].

Результаты анализа данных литературы позволили выяснить, что в качестве необходимых добавок в бессывороточной среде используют альбумин, инсулин, трансферрин, селенит, L-глутамин и смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина [21]. На основании этих сведений на начальном этапе разработки методики составлены несколько вариантов БСТР, которые были использованы для оценки способности опухолевых клеток РЯ формировать 3D-структуры (сфероиды).

Клетки линий А-1847, Ovcar-3 и Ovcar-4 культивировали в бессывороточных средах в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Corning, США) в количестве 20 000 клеток на образец. На 6-й день сформировавшиеся 3D-структуры осаждали центри-

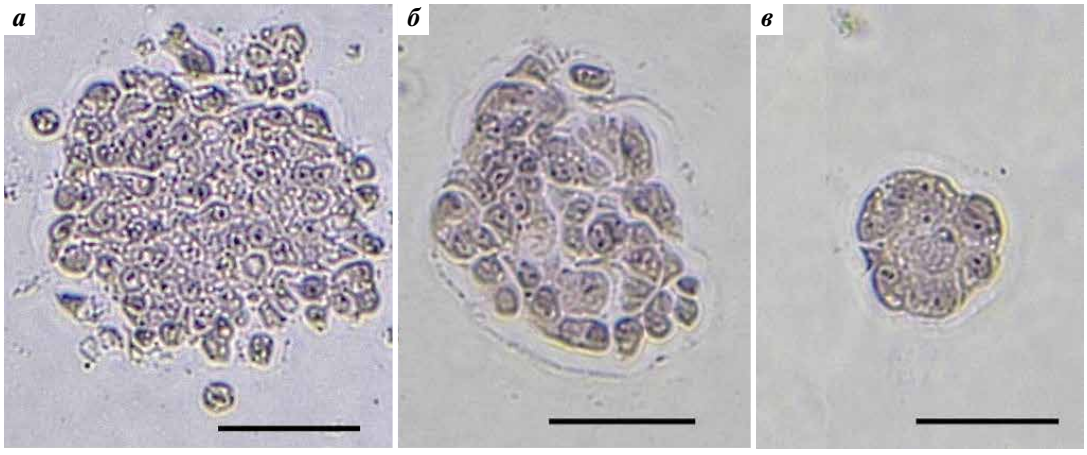

Рис. 1. *Микроскопия сфероидов, образовавшихся после культивирования суспензии клеток линий рака яичников: а – А-1847; б – Ovcar-3; в – Ovcar-4. Окраска гематоксилином и эозином, ×50 мкм*

Fig. 1. *Microscopy of spheroids formed after culturing a suspension of ovarian cancer cell lines: а – А-1847; б – Ovcar-3; в – Ovcar-4. Hematoxylin and eosin staining, ×50 μm*

фугированием и проводили гистологический анализ сфероидов. По данным микроскопического анализа наилучшие результаты по формированию сфероидов получены для БСТР3, которая и была использована в дальнейшем исследовании (рис. 1).

Определение динамики количества жизнеспособных клеток рака яичников при культивировании в гипоадгезионных условиях. Клетки линий РЯ А-1847, Ovcar-3 и Ovcar-4 культивировали в гипоадгезионных условиях в БСТР3 в 96-луночных полипропиленовых планшетах (Corning, США). Количество живых клеток в образце оценивали ежедневно до 6-го дня культивирования с использованием трипанового синего.

Установлено, что на 2-й и 3-й дни культивирования количество жизнеспособных клеток рака яичника линии А-1847 увеличивается в 2,1 и 2,4 раза по сравнению с 1-м днем соответственно, а затем начинает снижаться и составляет 177, 99 и 73 % на 4-, 5- и 6-й дни соответственно. Клетки Ovcar-3 продемонстрировали меньшую способность к пролиферации в гипоадгезионных условиях. На 2-й и 3-й дни культивирования количество жизнеспособных клеток составило 85 и 87 % соответственно по отношению к 1-му дню, но на 4-, 5- и 6-й дни увеличилось до 117, 137 и 141 % соответственно. При культивировании клеток линии Ovcar-4 на 2-й день их жизнеспособность снизилась до 94 %, а затем, в течение последующих 3–6 дней культивирования количество живых клеток в образце составило 127–148 % от исходного (рис. 2).

Таким образом, при использовании указанного протокола культивирования клеток РЯ в гипоадгезионных условиях к 5–6-му дням культивирования сохраняется высокая доля жизнеспособных клеток, что позволяет использовать данные условия при проведении теста на химиорезистентность опухолевых клеток *in vitro*.

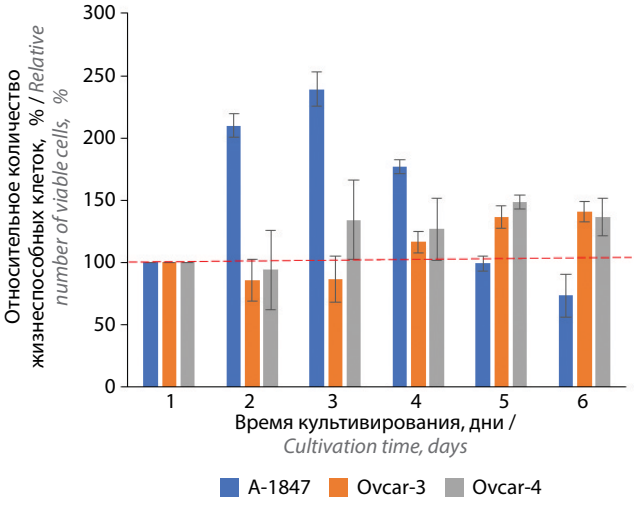

Рис. 2. *Динамика относительного количества жизнеспособных клеток рака яичников, культивируемых в гипоадгезионных условиях в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3*
Fig. 2. *Dynamics of the relative number of viable ovarian cancer cells cultured under hypoadhesive conditions in serum-free medium for resistance testing 3*

Определение оптимального количества клеток и времени инкубации при выполнении теста на жизнеспособность по метаболизму резазурина. В качестве метода определения жизнеспособности в тесте ATP-TCA используется люминометрия, позволяющая оценить уровень АТФ, хорошо коррелирующий с количеством живых клеток. В ходе разработки методики мы решили определить возможность использования флуориметрии после добавления резазурина вместо люминометрии в качестве метода количественной оценки жизнеспособности клеток. Выбор флуориметрии обусловлен довольно высокой чувствительностью этого метода, а также его доступностью, воспроизводимостью и удобством в использовании. Также его преимуществом является наличие флуориметров (в отличие от люминометров), которые зарегистрированы в Российской Федерации.

Определение влияния цитостатиков на жизнеспособность клеток после добавления резазурина основано на зависимости интенсивности сигнала флуоресценции резоруфина – продукта метаболизма резазурина, образуемого в определенный интервал времени, – от количества клеток в образце. Поскольку минимальное количество клеток, которое должно быть в образце, ограничено чувствительностью метода детекции сигнала, а максимальное – полным истощением субстрата реакции, необходимо определить оптимальное количество клеток для добавления в образец для проведения теста на химиорезистентность. Кроме того, из-за отсутствия единого протокола регистрации жизнеспособности клеток методом флуориметрии после добавления резазурина важно выяснить оптимальное время культивирования клеток с этим соединением до проведения флуориметрии. Для решения вышеуказанных задач определен уровень значимости различий интенсивности флуоресценции резоруфина между образцами с разным количеством клеток РЯ, культивируемых с данным соединением в течение различных временны́х интервалов.

Образцы с различным количеством клеток РЯ линий А-1847, Ovcar-3 и Ovcar-4, полученные путем серий двукратного разведения от 80 000 до 156 клеток/образец, культивировали в БСТР3 в полипропиленовых планшетах в течение 4, 8, 12 и 16 ч после добавления резазурина. Затем оценивали жизнеспособность клеток по метаболизму резазурина методом флуориметрии. Полученные данные использовали для определения статистической значимости различий интенсивности флуоресценции между образцами с различным количеством жизнеспособных клеток, оцениваемой с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-тестом Тьюки (табл. 1–3).

Согласно полученным данным при определении жизнеспособности клеток по метаболизму резазурина оптимальным являеяется 10 000–30 000 клеток в образце. Поскольку к 5–6-му дням количество клеток всех используемых линий РЯ составило от 73 до 148 % от изначально добавленных в образец (см. рис. 2), в качестве оптимальной для постановки теста была выбрана

Таблица 1. *Уровень статистической значимости различий интенсивности флуоресценции резоруфина в образцах с разным количеством клеток A-1847*

Table 1. *Statistical significance level of differences in resorufin fluorescence intensity in samples with different numbers of A-1847 cells*

Время инкубации, ч Incubation duration, h	Количество живых клеток в экспериментальном образце Number of living cells in the experimental sample	Количество живых клеток в контрольном образце Number of living cells in the control sample									
		80 000	40 000	20 000	10 000	5000	2500	1250	625	312	156
4	40 000	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				>0,05	–	–	–	–	–	–
	2500					>0,05	–	–	–	–	–
	1250				<0,05		>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312								>0,05	>0,05	–
	156										>0,05
	0										
8	40 000	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				<0,005	–	–	–	–	–	–
	2500				<0,0001	>0,05	–	–	–	–	–
	1250						>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312					<0,05	>0,05		>0,05	–	–
	156					>0,05				>0,05	–
	0					<0,01					>0,05
12	40 000	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				<0,0001	–	–	–	–	–	–
	2500					>0,05	–	–	–	–	–
	1250					<0,001	>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312					<0,0005			>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05
16	40 000	<0,0001	<0,0005	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	10 000				<0,0001	–	–	–	–	–	–
	5000					–	–	–	–	–	–
	2500					<0,01	–	–	–	–	–
	1250					<0,0001	>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312						>0,05		>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05

Примечание. *Здесь и в табл. 2, 3: зеленым цветом отмечены статистически значимые различия, розовым — незначимые. ANOVA с пост-тестом Тьюки, приведены значения p.*

Note. *Here and in Tables 2, 3: statistically significant differences are shown in green, not significant in pink. ANOVA with Tukey's post-test, p values are presented.*

Таблица 2. *Уровень статистической значимости различий интенсивности флуоресценции резоруфина в образцах с разным количеством клеток Ovcar-3*

Table 2. *Statistical significance Level of differences in resorufin fluorescence intensity in samples with different numbers of Ovcar-3 cells*

Время инкубации, ч Incubation duration, h	Количество живых клеток в экспериментальном образце Number of living cells in the experimental sample	Количество живых клеток в контрольном образце Number of living cells in the control sample								
		80 000	40 000	20 000	10 000	5000	2500	1250	625	312	156
4	40 000	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				>0,05	–	–	–	–	–	–
	2500				<0,05	>0,05	–	–	–	–	–
	1250						>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312								>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05
8	40 000	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,05	–	–	–	–	–	–	–
	5000				>0,05	–	–	–	–	–	–
	2500			<0,0001		>0,05	–	–	–	–	–
	1250						>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312								>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05
12	40 000	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,05	–	–	–	–	–	–	–
	5000			<0,0001	>0,05	–	–	–	–	–	–
	2500					>0,05	–	–	–	–	–
	1250				<0,05		>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312								>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05
16	40 000	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				<0,05	–	–	–	–	–	–
	2500				<0,0001	>0,05	–	–	–	–	–
	1250						>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312								>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05

Таблица 3. *Уровень статистической значимости различий интенсивности флуоресценции резоруфина в образцах с разным количеством клеток Ovcar-4*

Table 3. *Level of statistical significance of differences in resorufin fluorescence intensity in samples with different numbers of Ovcar-4 cells*

Время инкубации, ч Incubation duration, h	Количество живых клеток в экспериментальном образце Number of living cells in the experimental sample	Количество живых клеток в контрольном образце Number of living cells in the control sample									
		80 000	40 000	20 000	10 000	5000	2500	1250	625	312	156
4	40 000	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000		<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				<0,05	–	–	–	–	–	–
	2500				<0,0001	>0,05	–	–	–	–	–
	1250						>0,05	–	–	–	–
	625					<0,05		>0,05	–	–	–
	312								>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05
8	40 000	>0,05	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000	<0,0001	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				<0,0001	–	–	–	–	–	–
	2500					>0,05	–	–	–	–	–
	1250					<0,05	>0,05	–	–	–	–
	625							–	–	–	–
	312								>0,05	–	–
	156					<0,0001				>0,05	–
	0										>0,05
12	40 000	>0,05	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000	<0,0001	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				<0,0001	–	–	–	–	–	–
	2500					<0,05	–	–	–	–	–
	1250					<0,0001	>0,05	–	–	–	–
	625							>0,05	–	–	–
	312								>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05
16	40 000	>0,05	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	20 000	<0,0001	<0,0001	–	–	–	–	–	–	–	–
	10 000			<0,0001	–	–	–	–	–	–	–
	5000				<0,0001	–	–	–	–	–	–
	2500					<0,0001	–	–	–	–	–
	1250						>0,05	–	–	–	–
	625						<0,05	>0,05	–	–	–
	312								>0,05	–	–
	156									>0,05	–
	0										>0,05

концентрация 20 000 клеток в образце. Дополнительно установлено, что увеличение времени инкубации с резазурином с 4 до 16 ч приводит к увеличению статистически значимых различий в интенсивности флуоресценции образцов, содержащих более низкие концентрации клеток. Это можно рассматривать в качестве аргумента в пользу выбора 16 ч в качестве требуемого интервала обработки клеток, поскольку обработка цитостатиком должна приводить к уменьшению количества клеток. В то же время увеличение продолжительности инкубации клеток с резазурином для линии Ovcar-4 с 4 до 16 ч приводит к исчезновению различий в интенсивности флуоресценции в образцах, содержащих изначально 80 000 и 40 000 клеток. В связи с этим определение интенсивности флуоресценции при инкубации с резазурином в течение 16 ч свидетельствует о необходимости контроля над количеством клеток в образце.

Таким образом, при анализе образцов, изначально содержащих 10 000–30 000 клеток, инкубация с резазурином продолжительностью 12–16 ч была признана в качестве оптимальной.

Сравнительный анализ определения резистентности опухолевых клеток линий рака яичников и первичных культур с использованием теста ATP-TCA и разработанного протокола тестирования. Для оценки результатов тестирования с использованием набора реактивов ATP-TCA проводят расчет RSI, отражающего дозозависимый эффект гибели клеток при их культивировании в разных концентрациях цитостатика. Результаты ряда исследований показали корреляцию значения RSI с клиническим ответом на терапию цитостатиком, включая показатели безрецидивной и общей выживаемости [18, 22].

В ходе сравнительного анализа результатов тестирования на резистентность, полученных с использованием набора ATP-TCA и разработанного нами протокола, включающего культивирование клеток в БСТР3 в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (протокол БСТР3-РЕЗ), для всех клеточных культур РЯ при применении обоих методов получена дозовая зависимость гибели клеток от концентрации цисплатина, паклитаксела и доксорубицина. Кривые доза–эффект

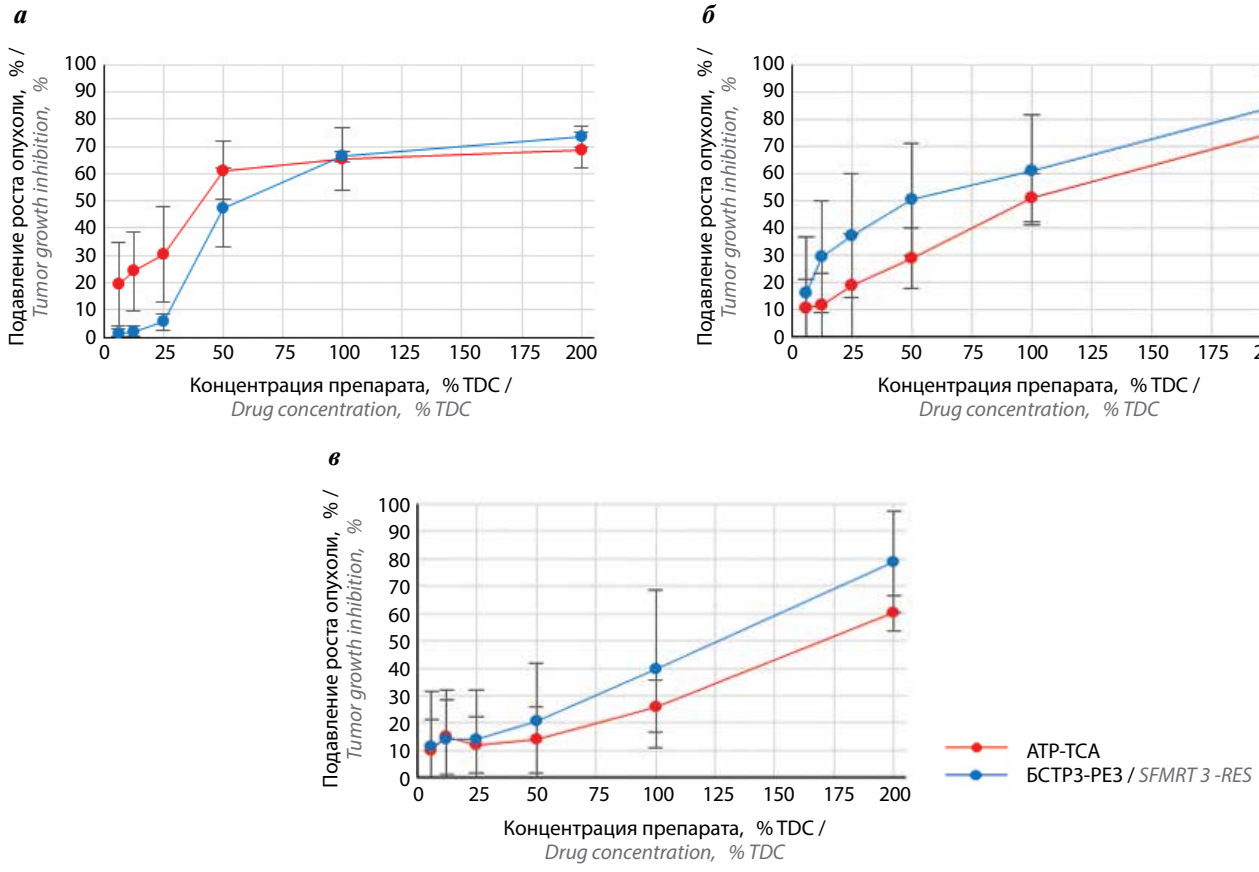

Рис. 3. *Дозозависимые эффекты гибели клеток линий рака яичников A-1847 (а), Ovcar-3 (б) и Ovcar-4 (в) в присутствии цисплатина. Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия). Показатель подавления роста опухоли представлен как среднее значение ± стандартное отклонение. TDC – тестовая концентрация препарата*

Fig. 3. *Dose-dependent effects of cell death of ovarian cancer cell lines A-1847 (a), Ovcar-3 (б) and Ovcar-4 (в) in the presence of cisplatin. Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany). Tumor growth suppression index is presented as mean + standard deviation. TDC – tested drug concentration*

для линий клеток РЯ A-1847, Ovcar-3 и Ovcar-4 для цисплатина представлены на рис. 3. Использование набора ATP-TCA основано на наличии дозозависимого эффекта. Его получение в протоколе БСТР3-РЕЗ позволило рассчитать и сравнить RSI для обоих методов (рис. 4). Следует отметить, что статистически значимых различий в RSI (*t*-критерий Стьюдента), рассчитанных в соответствии с результатами тестов при использовании ATP-TCA и БСТР3-РЕЗ, при воздействии цисплатина, паклитаксела и доксорубицина для всех линий РЯ выявлено не было (см. рис. 4).

Результаты исследования культур клеток РЯ позволили перейти к тестированию химиорезистентности с использованием протокола БСТР3-РЕЗ на первичных культурах клеток, полученных из образцов опухолевой ткани и асцитической жидкости пациенток с РЯ (пациентки 1–3). Выявлена возможность регистрации дозозависимого эффекта гибели клеток от концентрации цитостатика (рис. 5–7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально для прогноза резистентности к ХТ при РЯ использовали монослойные первичные культуры и ксенографты. Стабильные двумерные культуры

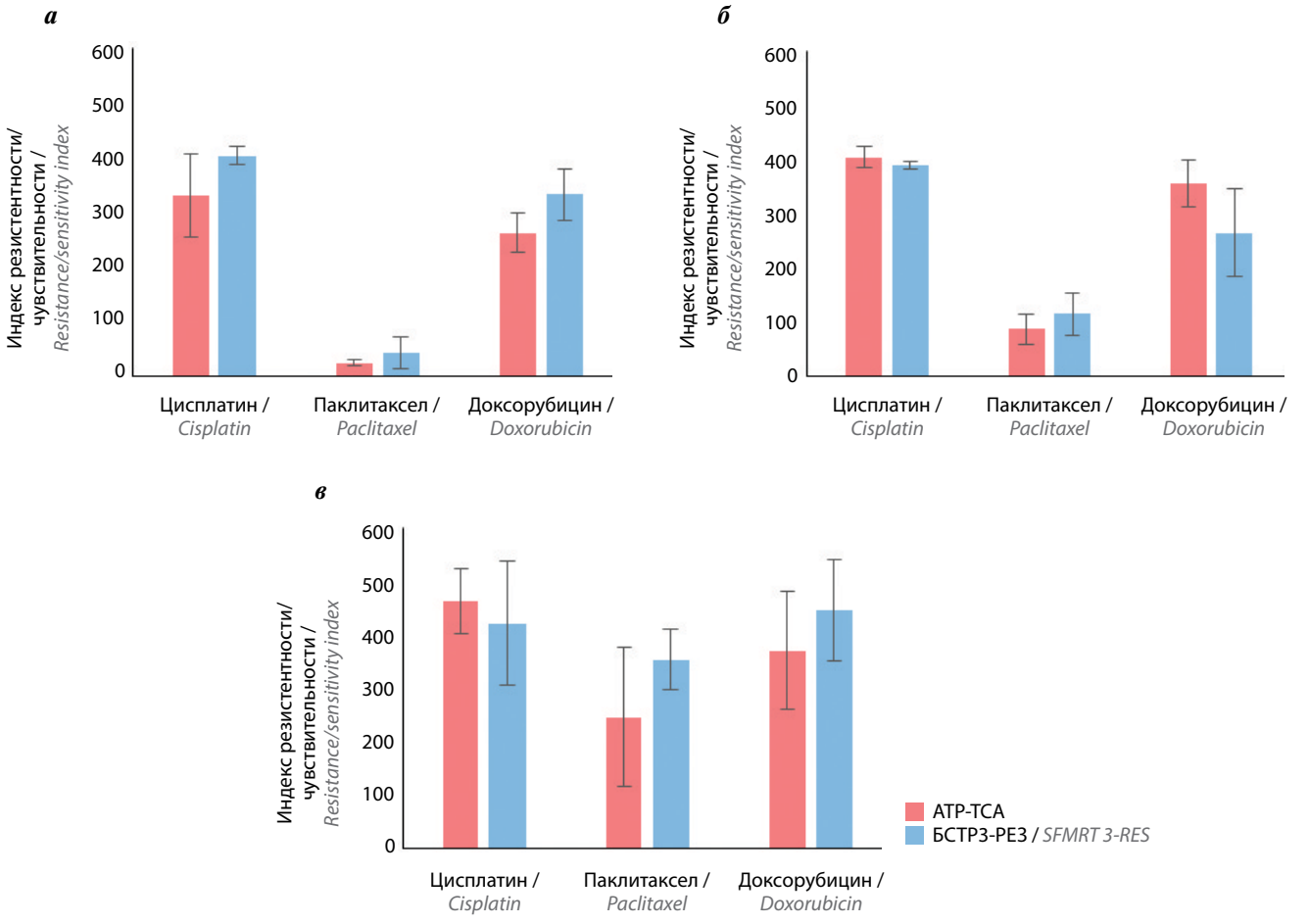

Рис. 4. *Индексы резистентности/чувствительности клеток линий рака яичников A-1847 (а), Ovcar-3 (б) и Ovcar-4 (в) для цисплатина, паклитаксела и доксорубицина (t-критерий Стьюдента). Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) и представлены как среднее значение + стандартное отклонение*

Fig. 4. *Cell resistance/sensitivity indices of ovarian cancer cell lines A-1847 (a), Ovcar-3 (б) and Ovcar-4 (в) for cisplatin, paclitaxel and doxorubicin (Student's t-test). Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) and presented as mean + standard deviation*

просты и легки в использовании. Однако в процессе пассирования ткань опухоли утрачивает гетерогенность, поскольку выживают только клетки, способные адаптироваться к существованию *in vitro*. Кроме того, в этих культурах не только отсутствуют стромальные клетки, но и изменены условия формирования внеклеточного матрикса. В результате этого профили экспрессии генов опухолевых клеток и клеток, существующих *in vivo*, различаются, что отражается на результатах тестирования, снижает прогностическую значимость таких тестов [14]. Использование ксенографтов РЯ в тестах на химиорезистентность не получило широкого применения в силу ограниченности успеха имплантации опухоли, трудоемкости процедуры, большой продолжительности роста имплантата и высокой стоимости метода.

Шагом вперед в развитии экспериментального тестирования опухолей на химиорезистентность стало использование переживающих 3D-культур, которые в большей степени сохраняют свойства исходной опухоли, такие как гетерогенность, клеточная/ядерная атипия и экспрессия биомаркеров. Создание 3D-культур РЯ с жизнеспособностью, достаточной для оценки их резистентности к химиопрепаратам, является непростой задачей, поскольку опухолевые клетки существуют в определенных условиях микроокружения, включающих внеклеточный матрикс и растворимые молекулы пара-, аутокринной и гуморальной регуляций. Одним из перспективных подходов является использование матригеля при культивировании опухолевых клеток в питательной среде, содержащей такие нишевые факторы, как ламинин, коллаген IV типа, нидоген, гепаринсульфат гликопротеин, факторы ро-

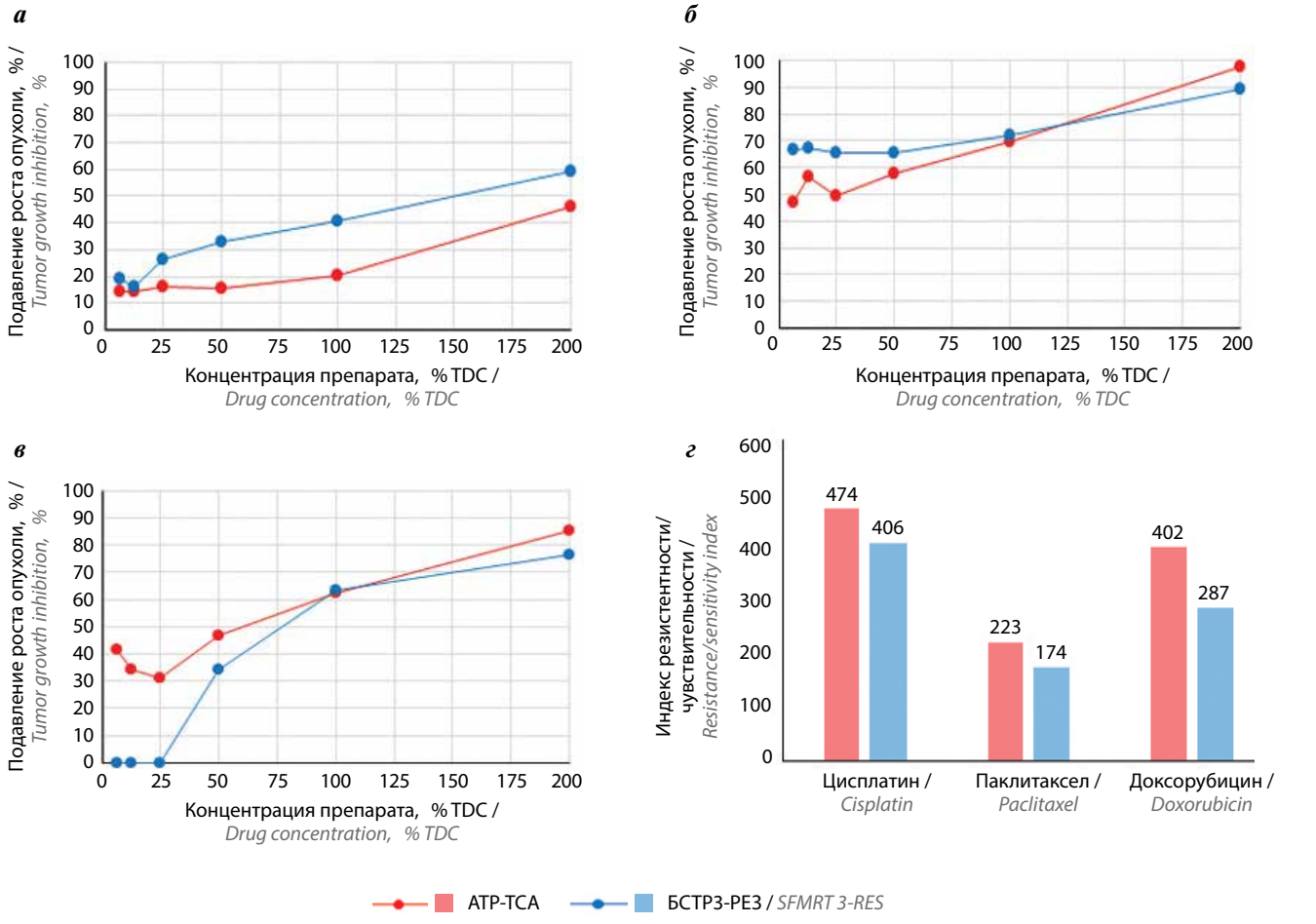

Рис. 5. *Дозозависимые эффекты гибели опухолевых клеток в присутствии цисплатина (а), паклитаксела (б) и доксорубицина (в). Индексы резистентности для цисплатина, паклитаксела и доксорубицина (г). Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) для первичной культуры рака яичников из образца опухолевой ткани пациентки 1*

Fig. 5. *Dose-dependent effects of tumor cell death in the presence of cisplatin (a), paclitaxel (б) and doxorubicin (в). Resistance indices for cisplatin, paclitaxel and doxorubicin (г). Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) for primary ovarian cancer cell culture from the tumor of patient 1*

ста и матриксные металлопротеиназы. В данных условиях трехмерные структуры могут существовать в течение месяца и формировать стабильные 3D-культуры, сохраняющие профиль резистентности к химиопрепаратам, характерный для исходной опухоли [23].

Для экспресс-анализа резистентности конкретной опухоли к химиопрепаратам могут быть использованы 3D-культуры с упрощенными условиями культивирования и более кратким временем их использования – от 5 до 10 дней [22]. Путем варьирования состава бессывороточной среды мы подобрали вариант среды БСТР3. В ней клетки стабильных линий РЯ формировали жизнеспособные сфероиды, что подтверждено с помощью их гистологического анализа. Результаты оценки динамики роста клеток линий РЯ при культивировании в БСТР3 в полипропиленовых планшетах показали, что количество жизнеспособных клеток линий РЯ на 6-й день составило от 73 до 148 % от исходного. Это позволило сделать вывод о возможности использования данных условий при экспериментальном тестировании опухолевых клеток на химиорезистентность. Жизнеспособность клеток определяли по уровню флуоресценции резоруфина – продукта метаболизма резазурина. Оценка жизнеспособности клеток по их метаболической активности является стандартным, распространенным подходом при работе с культивируемыми клетками [11]. Ранее в качестве метаболизируемого соединения чаще всего использовали 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, известный под названием MTT, однако применение вместо него резазурина, метаболизируемого более широким спектром ферментов по сравнению с MTT до флуоресцирующего резоруфина, повысило чувствительность и надежность метода.

Еще более чувствительным и надежным методом, разработанным для использования вместо MTT-теста, является метод CellTiter-Glo®, основанный на измерении количества АТФ. Однако для детекции АТФ

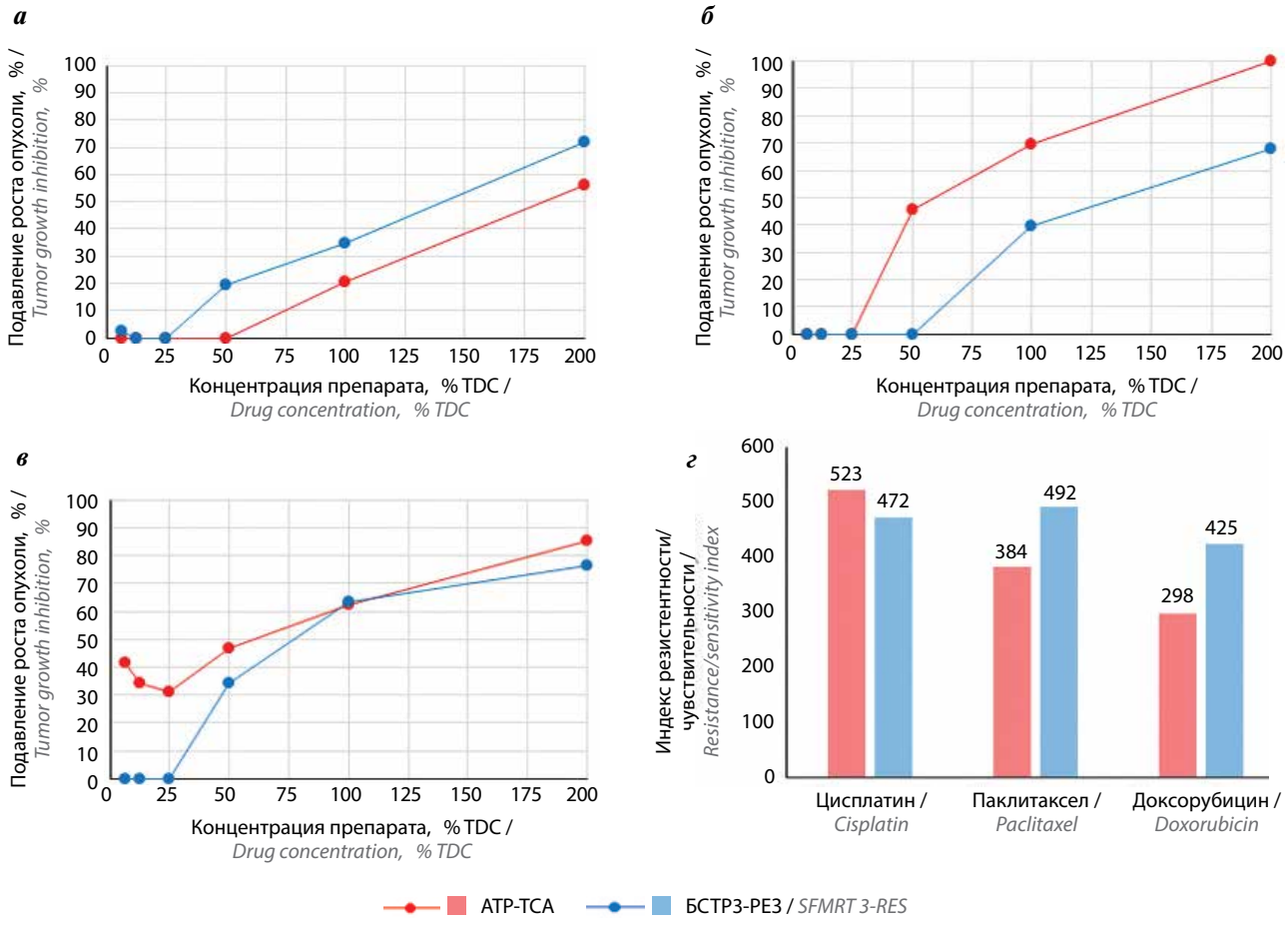

Рис. 6. *Дозозависимые эффекты гибели опухолевых клеток в присутствии цисплатина (а), паклитаксела (б) и доксорубицина (в). Индексы резистентности для цисплатина, паклитаксела и доксорубицина (г). Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) для первичной культуры рака яичников из образца опухолевой ткани пациентки 2*

Fig. 6. *Dose-dependent effects of tumor cell death in the presence of cisplatin (a), paclitaxel (б) and doxorubicin (в). Resistance indices for cisplatin, paclitaxel and doxorubicin (г). Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) for primary ovarian cancer cell culture from the tumor of patient 2*

требуются люминометры, которые не используются в медицинских учреждениях нашей страны. В связи с этим в настоящем исследовании использован резазуриновый метод. В то же время интегральный уровень флуоресценции резоруфина в образце зависит от множества факторов: условий культивирования клеток, уровня метаболической активности ферментов, количества клеток, продолжительности инкубации с детектирующим агентом и некоторых других параметров [24]. В связи с этим получение релевантных воспроизводимых результатов резазуринового теста, направленного на определение жизнеспособности клеток конкретного нозологического типа опухолей требует валидации условий его проведения. Для валидации метода определения жизнеспособности клеток по уровню метаболизма резазурина проанализированы различия в интенсивности флуоресценции резоруфина в образцах с разным количеством клеток РЯ и в продолжительности инкубации (см. табл. 1–3). Показано, что оптимальным для данного способа определения жизнеспособности клеток является их количество в образце от 10 000 до 30 000. Принимая во внимание показатели динамики количества жизнеспособных клеток на 6-й день инкубации (73–148 %), сделан вывод, что использование 20 000 клеток в исходном экспериментальном образце является оптимальным. Также установлено, что 12–16 ч – это оптимальная продолжительность инкубации с резазурином опухолевых клеток РЯ 3 рассматриваемых линий, если количество клеток в образце не превышает 40 000. Такая продолжительность инкубации является допустимой из-за низкой цитотоксичности резазурина [25]. Таким образом, мы разработали протокол культивирования опухолевых клеток РЯ в гипоадгезионных

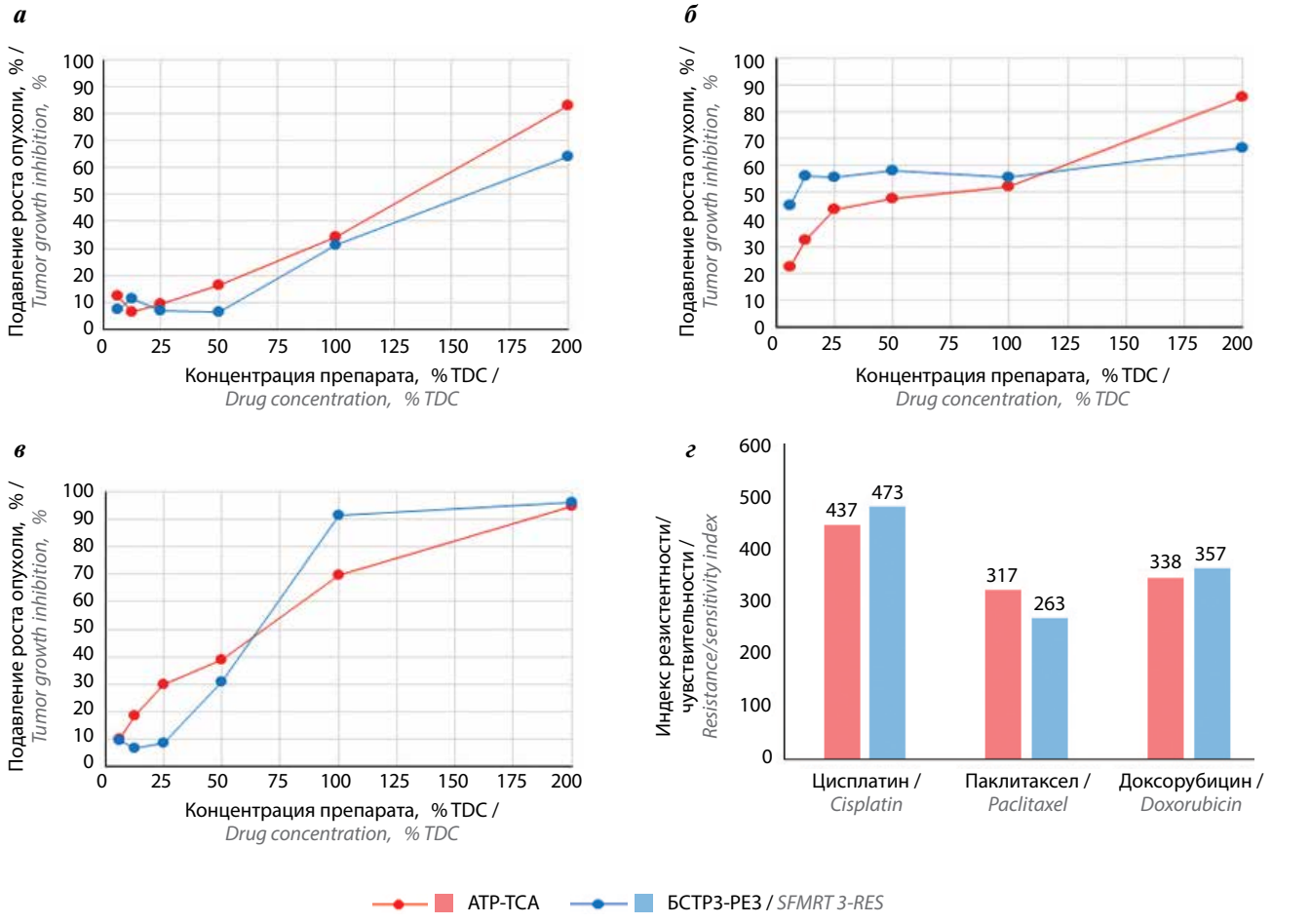

Рис. 7. *Дозозависимые эффекты гибели опухолевых клеток в присутствии: цисплатина (а), паклитаксела (б) и доксорубицина (в). Индексы резистентности для цисплатина, паклитаксела и доксорубицина (г). Данные получены с использованием протокола, включающего культивирование клеток в бессывороточной среде для тестирования резистентности 3 (БСТР3) в полипропиленовых планшетах и оценку жизнеспособности по метаболизму резазурина (БСТР3-РЕЗ), и с применением набора ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Германия) для первичной культуры рака яичников из образца опухолевой ткани пациентки 3*

Fig. 7. *Dose-dependent effects of tumor cell death in the presence of cisplatin (a), paclitaxel (б) and doxorubicin (в). Resistance indices for cisplatin, paclitaxel and doxorubicin (г). Data obtained using a protocol which includes cell culture in serum-free medium for resistance testing 3 (SFMRT 3) in polypropylene plates and viability determination based on resazurin metabolism (SFMRT3-RES) and using ATP-Tumor Chemosensitivity Assay (ATP-TCA) (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) for primary ovarian cancer cell culture from the tumor of patient 3*

условиях, позволяющий протестировать химиорезистентность.

В качестве прототипа разрабатываемого протокола определения химиорезистентности *in vitro* рассматривается созданный рядом исследователей метод выявления химиорезистентности опухолевых клеток РЯ с использованием набора ATP-TCA. Его преимуществами являются простота, межлабораторная воспроизводимость и то, что он применяется в клинической практике в Германии. На 3 стабильных линиях и первичных культурах РЯ с использованием созданного нами протокола тестирования химиорезистентности продемонстрирована возможность регистрации дозозависимого эффекта гибели клеток в присутствии цитостатиков. Дополнительно в ходе сравнительного анализа результатов определения химиорезистентности опухолевых клеток, полученных с использованием протокола БСТР3-РЕЗ и набора ATP-TCA, выявлено отсутствие значимых различий в значениях RSI. Результаты пилотного исследования пригодности разработанных нами упрощенных условий анализа резистентности/чувствительности первичных 3D-культур солидных и асцитических вариантов РЯ (образцы операционного материала пациенток) показали, что данные тестирования по разработанному протоколу практически не отличаются от данных, полученных с использованием стандартного метода, принятого за рубежом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тестирование химиорезистентности опухолевых клеток в первичных 3D-культурах основано на взаимосвязи уровня их жизнеспособности в присутствии цитостатика в концентрациях, сопоставимых с содержанием в организме пациента, и клиническими результатами терапии этим агентом. Выявленное нами дозозависимое влияние цитостатиков на жизнеспособность опухолевых клеток в 3D-культурах пациенток с РЯ свидетельствует о перспективности дальнейших исследований, направленных на определение корреляции между результатами экспериментального тестирования и клиническими данными. Для этой цели может быть использован разработанный нами упрощенный метод получения первичных 3D-культур, который соответствует стандарту, принятому за рубежом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. Москва. МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. 276 с.
   Malignant neoplasms in Russia in 2023 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2024. 276 p. (In Russ.).
2. Siegel R.L., Kratzer T.B., Giaquinto A.N. et al. Cancer statistics, 2025. CA Cancer J Clin 2025;75(1):10–45. DOI: 10.3322/caac.21871
3. Покатаев И.А., Дудина И.А., Коломиец Л.А. и др. Рак яичников, первичный рак брюшины и рак маточных труб. Злокачественные опухоли 2024;14(3s2–2):82–101. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-02
   Pokataev I.A., Dudina I.A., Kolomiets L.A. et al. Ovarian cancer, primary peritoneal cancer, and fallopian tube cancer. Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors 2024;14(3s2–2):82–101. DOI: 10.18027/2224-5057-2024-14-3s2-1.2-02
4. Ledermann J.A., Matias-Guiu X., Amant F. et al. ESGO–ESMO–ESP consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology and early, advanced and recurrent disease. Ann Oncol 2024;35(3):248–66. DOI: 10.1016/j.annonc.2023.11.015
5. Pignata S., Cecere S.C., Du Bois A. et al. Treatment of recurrent ovarian cancer. Ann Oncol 2017;28(suppl_8):viii51–6. DOI: 10.1093/annonc/mdx441
6. Miras I., Estévez-García P., Muñoz-Galván S. Clinical and molecular features of platinum resistance in ovarian cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2024;201:104434. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2024.104434
7. Havasi A., Cainap S.S., Havasi A.T., Cainap C. Ovarian cancer – insights into platinum resistance and overcoming it. Medicina (Kaunas) 2023;59(3):544. DOI: 10.3390/medicina59030544
8. Baert T., Ferrero A., Sehouli J. et al. The systemic treatment of recurrent ovarian cancer revisited. Ann Oncol 2021;32(6):710–25. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.02.015
9. Monk B.J., Herzog T.J., Tewari K.S. Evolution of chemosensitivity and resistance assays as predictors of clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients. Curr Pharm Des 2016;22(30):4717–28. DOI: 10.2174/1381612822666160505114326
10. Имянитов Е.Н. Принципы индивидуализации противоопухолевой терапии. Практическая онкология 2013;14(4):187–94.
    Imyanitov E.N. Principles of individualization of antitumor therapy. Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology 2013;14(4):187–94.
11. Кирсанов К.И., Кузин К.А., Фетисов Т.И. и др. Методические подходы к экспериментальному тестированию резистентности клеток опухоли человека к химиотерапии. Сибирский онкологический журнал 2020;19(3):122–36. DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-122-136
    Kirsanov K.I., Kuzin K.A., Fetisov T.I. et al. Methodological approaches to the determination of chemoresistance of human cancer cells to anti-cancer drugs. Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2020;19(3):122–36. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-122-136
12. Singh T., Neal A.S., Moatamed N.A., Memarzadeh S. Exploring the potential of drug response assays for precision medicine in ovarian cancer. Int J Mol Sci 2021; 22(1):305. DOI: 10.3390/ijms22010305
13. Blom K., Nygren P., Larsson R., Andersson C.R. Predictive value of *ex vivo* chemosensitivity assays for individualized cancer chemotherapy: a meta-analysis. SLAS Technol 2017;22(3):306–14. DOI: 10.1177/2472630316686297

14. Maru Y., Hippo Y. Current status of patient-derived ovarian cancer models. Cells May 2019;8(5):505. DOI: 10.3390/cells8050505
15. Blumenthal R.D. An overview of chemosensitivity testing. Methods Molecul Med 2005:110:3–18. DOI: 10.1385/1-59259-869-2:003
16. Grendys E.C., Florica J.V., Orr J.W. et al. Overview of a chemoresponse assay in ovarian cancer. Clin Transl Oncol 2014;16(9):761–9. DOI: 10.1007/s12094-014-1192-8
17. Konecny G., Crohns C., Pegram M. et al. Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer. Gynecol Oncol 2000;77(2):258–63. DOI: 10.1006/gyno.2000.5728
18. Kurbacher C.M., Cree I.A. Chemosensitivity testing using microplate adenosine triphosphate-based luminescence measurements. Methods Mol Med 2005;2005;110:101–20. DOI: 10.1385/1-59259-869-2:101
19. Andreotti P.E., Cree I.A., Kurbacher C.M. et al. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. Cancer Res 1995;15;55(22):5276–82.
20. Cortesi M., Warton K., Ford C.E. Beyond 2D cell cultures: how 3D models are changing the in vitro study of ovarian cancer and how to make the most of them. Peer J 29;12:e17603. DOI: 10.7717/peerj.17603
21. Denry Sato J., Kan M. Media for culture of mammalian cells. Curr Protoc Cell Biol. 2001;Chapter 1:Unit 1.2. DOI: 10.1002/0471143030.cb0102s00
22. Neubauer H., Stefanova M., Solomyer E. et al. Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer. Anticancer Res 2008;28(2A):949–56.
23. Nanki Y., Chiyoda T., Hirasawa A. et al. Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing. Sci Rep 2020;10(1):12581. DOI: 10.1038/s41598-020-69488-9
24. Rodríguez-Corrales J., Josan J.S. Resazurin live cell assay: Setup and fine-tuning for reliable cytotoxicity results. Methods Mol Biol 2017;1647:207–219. DOI: 10.1007/978-1-4939-7201-2_14
25. Gong X., Liang Z., Yang Y. et al. A resazurin-based, nondestructive assay for monitoring cell proliferation during a scaffold-based 3D culture process. Regen Biomater 2020;7(3):271–81. DOI: 10.1093/rb/rbaa002

Вклад авторов
К.А. Кузин: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, анализ данных, написание текста статьи;
Т.И. Фетисов, О.А. Власова: проведение экспериментов;
Р.И. Князев: получение и характеристика клинических образцов, редактирование;
Е.Е. Антошина, Л.С. Труханова, Т.Г. Горькова: получение и характеристика клинических образцов, проведение экспериментов;
Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов: разработка дизайна исследования, руководство проектом, редактирование.
Authors' contributions
K.A. Kuzin: research design development, conducting experiments, data analysis, article writing;
T.I. Fetisov, O.A.Vlasova: conducting experiments;
R.I. Knyazev: obtaining and characterization of clinical samples, editing;
E.E. Antoshina, L.S. Trukhanova, T.G. Gor'kova: obtaining and characterization of clinical samples, conducting experiments;
G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov: research design development, project management, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
К.А. Кузин / K.A. Kuzin: https://orcid.org/0000-0001-8474-8195
Т.И. Фетисов / T.I. Fetisov: https://orcid.org/0000-0002-5082-9883
О.А. Власова / O.A. Vlasova: https://orcid.org/0000-0002-1498-849X
Р.И. Князев / R.I. Knyazev: https://orcid.org/0000-0002-6341-0897
Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: https://orcid.org/0000-0002-3167-7204
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: https://orcid.org/0000-0002-9710-8178
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: https://orcid.org/0000-0002-8599-6833

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Financing. The work was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики
Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол от 30.05.2019).
Compliance with principles of bioethics
The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol dated 30.05.2019).

Статья поступила: 29.04.2025. **Принята к публикации:** 11.08.2025. **Опубликована онлайн:** 06.10.2025.
Article submitted: 29.04.2025. **Accepted for publication:** 11.08.2025. **Published online:** 06.10.2025.