

# ТЕСТИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕЙ ПАЦИЕНТОВ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2020.12.4.11

УДК 616–006.6:615.2–092.4

Поступила 27.02.2020 г.

© **И.Н. Дружкова**, младший научный сотрудник лаборатории флуоресцентного биоимиджинга НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>;  
**М.В. Ширманова**, к.б.н., зам. директора по науке НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>; зав. лабораторией флуоресцентного биоимиджинга НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>;  
**Д.С. Кузнецова**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>;  
**М.М. Лукина**, младший научный сотрудник лаборатории флуоресцентного биоимиджинга НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>;  
**Е.В. Загайнова**, д.м.н., член-корреспондент РАН, ректор<sup>2</sup>;  
главный научный сотрудник лаборатории оптической когерентной томографии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950

Лекарственная терапия по-прежнему остается одним из основных методов лечения рака различной этиологии, однако серьезной проблемой, ограничивающей ее эффективность, является устойчивость опухолей к действию препаратов. Для современной фундаментальной и клинической онкологии очевидна необходимость индивидуального подхода к лечению рака и учета биологических свойств опухоли при назначении препаратов химио- и таргетной терапии. Одна из главных стратегий для повышения эффективности противоопухолевой терапии — разработка предиктивных тестов, которые позволяют оценить чувствительность конкретной опухоли к конкретному препарату или комбинации еще до начала лечения и таким образом делают возможным индивидуальный подбор терапии.

В представленном обзоре рассмотрены основные подходы к оценке лекарственной чувствительности опухолей пациентов: молекулярно-генетическое профилирование опухолевых клеток и прямое тестирование эффективности препаратов на опухолевых клетках, выделенных из операционного или биопсийного материала. Проанализированы ключевые направления научных и клинических исследований в этой области, такие как поиск предиктивных молекулярных маркеров эффективности терапии; разработка способов поддержания опухолевых клеток или срезов в жизнеспособном состоянии в условиях, максимально приближенных к физиологическим; разработка высокопроизводительных систем оценки эффективности терапии. Отдельное внимание уделено реализации индивидуального подхода в лекарственном лечении колоректального рака.

**Ключевые слова:** лекарственная терапия рака; индивидуализация лечения рака; подбор противоопухолевой терапии; молекулярно-генетический анализ опухолей; тестирование препаратов *in vitro*.

**Как цитировать:** Druzhkova I.N., Shirmanova M.V., Kuznetsova D.S., Lukina M.M., Zagaynova E.V. Modern approaches to testing drug sensitivity of patients' tumors (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(4): 91–105, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.4.11>

Для контактов: Ширманова Марина Вадимовна, e-mail: Shirmanovam@gmail.com

## Modern Approaches to Testing Drug Sensitivity of Patients' Tumors (Review)

**I.N. Druzhkova**, Junior Researcher, Fluorescent Bio-imaging Laboratory, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**M.V. Shirmanova**, PhD, Deputy Director for Science, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>; Head of Fluorescent Bio-imaging Laboratory, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**D.S. Kuznetsova**, PhD, Researcher, Regenerative Medicine Laboratory, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**M.M. Lukina**, Junior Researcher, Fluorescent Bio-imaging Laboratory, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>;

**E.V. Zagaynova**, MD, DSc, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Rector<sup>2</sup>; Chief Researcher, Laboratory of Optical Coherence Tomography, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

<sup>2</sup>National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

Drug therapy is still one of the basic techniques used to treat cancers of different etiology. However, tumor resistance to drugs is a pressing problem limiting drug treatment efficacy. It is obvious for both modern fundamental and clinical oncology that there is the need for an individual approach to treating cancer taking into account the biological properties of a tumor when prescribing chemo- and targeted therapy. One of the promising strategies is to increase the antitumor therapy efficacy by developing predictive tests, which enable to evaluate the sensitivity of a particular tumor to a specific drug or a drug combination before the treatment initiation and, thus, make individual therapy selection possible.

The present review considers the main approaches to drug sensitivity assessment of patients' tumors: molecular genetic profiling of tumor cells, and direct efficiency testing of the drugs on tumor cells isolated from surgical or biopsy material. There were analyzed the key directions in research and clinical studies such as: the search for predictive molecular markers, the development of methods to maintain tumor cells or tissue sections viable, i.e. in a condition maximum close to their physiological state, the development of high throughput systems to assess therapy efficiency. Special attention was given to a patient-centered approach to drug therapy in colorectal cancer.

**Key words:** medical oncology; individualized cancer therapy; cancer treatment selection; molecular genetic tumor testing; drug testing *in vitro*.

### Введение

Значительный прогресс, достигнутый наукой в понимании механизмов канцерогенеза, привел к формированию в среде онкологов устойчивого мнения о необходимости персонального подхода к лечению рака. В результате действия многочисленных факторов, обеспечивающих внутри- и межопухолевую гетерогенность и высокую адаптационную способность опухолевых клеток, наблюдается различная реакция опухолей одного типа и стадии на одинаковое лекарственное лечение у разных пациентов. В конечном итоге это приводит к недостаточной эффективности терапии, развитию массы побочных эффектов и необоснованным затратам.

Первые попытки оценки чувствительности опухолевых клеток конкретного пациента к лекарственным препаратам с целью выбора наиболее эффективного предпринимались еще в 1970–80-х гг. XX в. Однако они не получили развития и массового внедрения в

клиники из-за ряда проблем. В частности, отмечалось, что длительное культивирование раковых клеток пациентов в виде клеточных культур значительно изменяет их состояние. Во-вторых, культивируемые раковые клетки могут реагировать на химиотерапевтические препараты совершенно иначе, чем раковые клетки в организме. И, кроме того, анализ состояния клеток после лечения в то время требовал привлечения высококвалифицированных патоморфологов.

В последнее десятилетие вопрос об индивидуализации лекарственной терапии получил «второе дыхание». Благодаря развитию технологий молекулярной и клеточной биологии, а также расширению спектра методов анализа структурно-функционального состояния клеток и тканей открывается возможность всесторонне и достаточно быстро исследовать послеоперационный и биопсийный материал пациентов в лабораторных условиях. Отдельными научными группами разрабатываются методики раскультивирования солидных опухолей, поддержания жизнеспособности образцов клеток

и тканей, предлагаются культуральные 3D-системы для создания условий, максимально приближенных к физиологическим, и моделирования взаимоотношений раковых клеток с их естественным микроокружением. Другие научные группы сосредотачивают усилия на разработке максимально информативных способов оценки терапевтического ответа опухолевых клеток пациентов. Третьи ведут поиск молекулярных маркеров для прогноза эффективности лечения. Однако каждая конкретная локализация опухоли требует разработки собственного уникального протокола, что связано с сильно различающимися биологическими свойствами клеток различного гистогенеза.

В структуре онкологической заболеваемости колоректальный рак — один из самых распространенных в мире, третий по частоте встречаемости у мужчин и второй — у женщин. В России на долю колоректального рака приходится чуть более 11% от всех онкологических заболеваний. В лечении колоректального рака традиционная химиотерапия является основным методом лекарственного лечения. Таргетная терапия при колоректальном раке применяется только при наличии метастазов в условиях отсутствия определенных мутаций. Однако выбор таргетных агентов для лечения колоректального рака ограничен, а их эффективность не всегда убедительна. Несмотря на доступность операционного материала, лекарственная чувствительность колоректальных опухолей до сих пор недостаточно изучена.

Данный обзор посвящен анализу мировых тенденций в разработке методов тестирования индивидуальной лекарственной чувствительности опухолей пациентов. Систематизированы общие сведения о лекарственном лечении рака, описаны существующие подходы к оценке чувствительности опухолей к химио- и таргетной терапии, а также основные методики оценки ответа раковых клеток на терапевтическое воздействие. Отдельное внимание уделено реализации индивидуального подхода в лечении колоректального рака.

### Лекарственная терапия рака и обоснование необходимости ее индивидуализации

На сегодняшний день основными способами лечения рака остаются хирургический метод, лучевое и лекарственное лечение, к которому можно отнести гормоно-, химио- и таргетную терапию.

Выбор лекарственной терапии основан на классических клинических диагностических критериях, таких как размер опухоли, стадия заболевания, гистологический анализ опухоли, а также наличие или отсутствие стандартных маркеров — в случаях с таргетной терапией.

Химиотерапия является стандартным методом лечения опухолей различных локализаций, основанным на введении в организм пациента химиотерапевтических агентов [1]. На сегодняшний день существует не-

сколько различных классов противоопухолевых препаратов, имеющих разный механизм действия:

1) алкилирующие антинеопластические агенты — нацелены на повреждение молекулы ДНК;

2) антиметаболиты — ингибируют ряд важных биохимических процессов, необходимых для пролиферативной функции клетки, а также приводят к запуску апоптоза;

3) антрациклиновые антибиотики — ингибируют синтез молекулы ДНК и нарушают проницаемость мембраны клетки;

4) ингибиторы топоизомеразы — избирательно нарушают структуру молекулы ДНК и деление опухолевых клеток на разных этапах митоза;

5) митотические ингибиторы — ингибируют митоз и деление клетки.

В клинических протоколах химиотерапии противоопухолевые агенты используют либо в комбинациях друг с другом, либо в качестве монопрепарата до или после операции. Выбор режима лечения зависит от локализации новообразования, стадии заболевания и других особенностей клинической картины пациента [2, 3].

Согласно рекомендациям [4, 5], в адъювантном лечении колоректального рака используются препараты оксалиплатин и 5-фторурацил (режимы FOLFOX, FLOX) или капецитабин (режим XELOX). В лекарственной терапии метастатического колоректального рака при наличии резектабельных метастазов рекомендованы те же препараты и режимы лечения, а также монотерапия фторпиримидинами; при нерезектабельных метастазах к оксалиплатину и 5-фторурацилу добавляется иринотекан (режим FOLFOXIRI).

Появление таргетной терапии существенно изменило подход к лечению злокачественных заболеваний, позволив назначать препараты на основании данных о характере опухоли конкретного пациента и показав возможность индивидуального подхода к лечению [6]. На сегодняшний день в клиническую практику внедрено девять прогностических маркеров, позволяющих определять чувствительность к определенному виду лечения и назначать таргетные препараты [7]. Основными типами таргетных препаратов являются малые молекулы — ингибиторы тирозинкиназ и серин/треонинкиназ — и моноклональные антитела к рецепторам HER2/Neu, рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) и рецептору сосудистого фактора роста (VEGF).

При лечении колоректального рака подходящие таргетные препараты назначаются на основе анализа мутаций. Согласно рекомендациям по лекарственному лечению рака прямой кишки, рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения [4, 5], молекулярный профиль опухоли должен учитываться при назначении таргетной терапии и выборе таргетного агента. Так, в случае отсутствия мутаций в генах *KRAS* и *BRAF* показано применение анти-EGFR-препаратов цетуксимаб или панитумумаб. Однако таргетная терапия не является основным методом при

колоректальном раке и назначается только при наличии метастазов.

Несмотря на возросшее понимание процессов злокачественной трансформации клеток, эффективность лечения большинства типов рака по-прежнему остается низкой. Одной из причин неэффективности лекарственного лечения является опухолевая гетерогенность — совокупность показателей, демонстрирующих меж- и/или внутриопухолевые различия. Опухоль представляет собой комплексную систему, неоднородную по своему клеточному пространству, молекулярному профилю и архитектурно-пространственной организации. Фенотипические, генетические, эпигенетические и другие характеристики, присущие отдельным клеткам или популяциям клеток, формируют чрезвычайно сложную и неоднородную структуру [8, 9]. Опухолевая гетерогенность является необходимым условием прогрессирования опухоли, выживания опухолевых клеток в неблагоприятных условиях, в том числе при воздействии противоопухолевыми препаратами, и развития лекарственной устойчивости [10].

Хорошо известно явление множественной лекарственной устойчивости, которое определяется целым рядом неспецифических факторов, включая высокую пластичность и гетерогенность опухоли, приобретение опухолевыми клетками вторичных генетических нарушений, опухолевое микроокружение [11, 12]. Лекарственная устойчивость может быть врожденной (ее еще называют предсуществующей или исходной) и приобретенной (или адаптивной), возникающей на фоне лечения. Довольно часто оказывается, что химиотерапевтические препараты, оказавшиеся эффективными в отношении первичного очага опухоли, не всегда сохраняют свое действие в отношении метастазов или в случае рецидива. Выраженность универсальных механизмов резистентности необходимо устанавливать по возможности до начала лечения.

Как классическая цитотоксическая химиотерапия, так и таргетная терапия сопровождаются рядом побочных явлений. Выраженные побочные эффекты требуют медикаментозной коррекции, снижают качество жизни, а иногда и приводят к отмене терапии.

Все вышеизложенные причины привели к формированию нового взгляда на противоопухолевое лечение и убедительно показали необходимость персонализированной медицины, суть которой заключается в детальном исследовании опухолевого материала пациента и подборе лекарственных препаратов, обладающих наибольшей эффективностью в отношении конкретной опухоли [13].

### Молекулярно-генетический анализ для реализации индивидуального подхода к лечению

Молекулярные факторы, в частности наличие мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*, ассоциированные с определенным гистологическим типом опухоли, могут

выступать в качестве важного прогностического критерия и определять изначальную или приобретенную чувствительность либо устойчивость опухолевых клеток к определенным видам лечения, включая лучевую терапию, многие виды цитостатиков, ряд таргетных препаратов, генотерапию и определенные методы специфической иммунотерапии [14, 15]. Эти гены являются ключевыми протоонкогенами, активирующимися в большинстве злокачественных опухолей, в том числе в раке толстого кишечника. Они кодируют белки семейства RAS, которые являются первыми членами каскада киназ, приводящих к активации сигнальных путей и транскрипции генов, регулирующих дифференцировку и пролиферацию клетки. Из мировой базы данных соматических мутаций в опухолях COSMIC (The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) известно, что около 34% проанализированных образцов опухолей толстого кишечника имеют мутации *KRAS*, 10% — *BRAF* и 4% — *NRAS*.

Молекулярно-генетический анализ мутационного статуса генов RAS-каскада *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* имеет важное прогностическое и предиктивное значение при лечении колоректального рака. Основные мутации в генах группы RAS в опухолях толстого кишечника локализуются в экзоне 2, кодонах 12 и 13. Однако встречаются мутации и в экзоне 3, кодоне 61, а также в экзоне 4, кодонах 117 и 146. Статус мутаций кодонов 12 и 13 гена *KRAS* является самым известным биомаркером в таргетной анти-EGFR-терапии пациентов с метастатическим колоректальным раком [16]. Доказано, что активация *KRAS* за счет мутации сводит на нет эффект ингибирования EGFR моноклональными антителами. Таким образом, наличие мутантных аллелей гена *KRAS* является независимым предсказательным маркером эффективности терапии ингибиторами EGFR [17]. Мутации, затрагивающие кодон 61, нарушают водородные связи между RAS и белками-инактиваторами, приводя к тому же эффекту, что и при нарушениях в кодонах 12 и 13 гена. Мутации кодона 146 не сопровождаются существенными изменениями активности протеина. Тем не менее эти мутации оказывают свое негативное воздействие в результате накопления дефектного белка на фоне аллельного дисбаланса — увеличения копийности мутантного гена или перехода его в гомозиготное состояние. Ряд клинических испытаний показал, что пациенты с диким типом генов *KRAS* и *NRAS* в опухоли получают максимальную пользу от терапии антителами в комбинации со стандартной химиотерапией, по сравнению с пациентами без мутаций гена *KRAS* в экзоне 2 [18–20].

Ген *BRAF* кодирует внутриклеточный белок, который является компонентом сигнальных каскадов RAS–MAPK и RAS–MEK–ERK, регулирующих пролиферацию клетки в ответ на внешние митогенные стимулы. Наиболее частой активирующей мутацией гена *BRAF* является точечная нуклеотидная замена, которая в 95% случаев затрагивает 600-й кодон экзо-

на 15 — V600E. Существуют противоречивые данные о предсказательной роли мутации *BRAF* V600E в отношении ответа опухоли на анти-EGFR-терапию и о прогностической значимости в отношении прогрессирования заболевания [21, 22], однако известно, что пациенты с мутацией в гене *BRAF* в опухоли являются обособленной группой с неблагоприятным течением болезни. При этом прогноз для пациентов с метастатической болезнью и мутацией в гене *BRAF* крайне неблагоприятный, что определяется агрессивным ростом опухоли. Однако определение статуса гена *BRAF* наряду с *KRAS* позволит провести более правильный отбор пациентов на терапию анти-EGFR-моноклональными антителами. Комбинированное применение ингибиторов генов *EGFR*, *BRAF*, *MEK* показывает обнадеживающие результаты, и введение еще одного биомаркера наряду с генами *KRAS* и *NRAS* позволит усилить персонализированный подход в терапии рака толстого кишечника [23].

Канцерогенез рака толстой кишки характеризуется накоплением мутаций в генах, контролирующих рост и дифференцировку эпителиальных клеток, что приводит к их генетической нестабильности [24]. Одним из вариантов данных генетических изменений является микросателлитная нестабильность, которая характеризуется нарушением механизма репарации неспаренных оснований ДНК. Это приводит к тому, что мутации в геноме клетки накапливаются со значительно большей скоростью, чем в нормальном состоянии. Микросателлитная нестабильность встречается в 15% спорадических опухолей толстой кишки и характерна для всех случаев синдрома Линча. Нарушения в системе репарации ДНК приводят к появлению инсерции и/или делеций нуклеотидных повторов в ДНК. Выявить эту неспособность к репарации неспаренных оснований ДНК можно по длине микросателлитов ДНК [25]. Отмечена связь наличия мутации в гене *BRAF* и состояния системы репарации неспаренных оснований ДНК. При микросателлитной нестабильности частота мутаций гена *BRAF* доходит до 50%, тогда как при микросателлитно-стабильных опухолях присутствие мутации в гене — событие крайне редкое. При этом только в последнем случае наличие мутации в гене *BRAF* ассоциировано с низкими показателями выживаемости при ранних стадиях болезни [23, 26]. Данный маркер служит больше для определения прогноза заболевания, а не для обоснования применения того или иного типа лечения.

Стоит отметить, что в случае с таргетной терапией предварительный анализ позволяет только определить наличие мишени для воздействия, но не учитывает степень чувствительности или устойчивости опухоли. Так, было показано [27, 28], что даже среди пациентов, у которых отсутствуют мутации в генах *KRAS* и *NRAS*, только 20–30% опухолей будут давать терапевтический ответ на анти-EGFR-препараты, а в случае комбинации с химиотерапией — 65–70%.

Для прогноза ответа опухоли на лечение традицион-

ными химиотерапевтическими препаратами также реализуется подход на основе анализа генома и протеома клеток. В частности, известны некоторые маркеры для прогнозирования эффективности препаратов, широко применяемых при колоректальном раке, — 5-фторурацила, иринотекана и оксалиплатина.

Переносимость и эффективность фторпиримидинов в значительной мере зависит от их системного и внутриопухолевого метаболизма. Ключевым ферментом распада 5-фторурацила является дигидропиримидин-дегидрогеназа (dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD). Некоторые индивидуумы имеют наследственный дефект, в результате которого обе (отцовская и материнская) копии гена *DPD* не могут продуцировать нормальный белок. Подобные люди, составляющие около 0,1% популяции, характеризуются выраженной непереносимостью фторпиримидинов: первое же введение стандартной дозы 5-фторурацила может привести к летальному исходу. Выявление лиц с системной инактивацией DPD требует полного секвенирования соответствующего гена [29].

Другим параметром, влияющим на исход лечения 5-фторурацилом и его производными, является внутриопухолевая активность DPD. Если системный дефицит DPD, определяемый наследственной мутацией в данном гене, представляет серьезную опасность, то низкая активность этого фермента в самой опухолевой ткани способствует накоплению препарата внутри новообразования. Многие опухоли имеют пониженную экспрессию DPD по сравнению с нормальными тканями — именно эта особенность карцином создает определенное терапевтическое окно для фторпиримидинов. Многочисленные исследования показывают, что колоректальный рак с низким содержанием DPD демонстрирует более выраженный ответ на терапию 5-фторурацилом [30].

Другим молекулярным фактором, ассоциированным с чувствительностью колоректального рака к 5-фторурацилу, является фермент тимидилатсинтаза (thymidylate synthase, TS), который считается основной мишенью 5-фторурацила. Высокая внутриопухолевая экспрессия TS зачастую сопряжена с резистентностью опухоли к фторпиримидинам. Это можно объяснить тем, что терапевтическая концентрация 5-фторурацила оказывается недостаточной для связывания избыточного количества молекул TS [31].

Тимидинфосфорилаза (thymidine phosphorylase, TP) — ключевой фермент синтеза и деградации пиримидиновых нуклеотидов. Антиапоптотический и ангиогенный эффекты TP задействованы в процессе роста и метастазирования колоректального рака. Кроме того, TP — ключевой фермент активации пролекарства 5-дезоксифторуридина в 5-фторурацил [32]. Гиперэкспрессия TP связана с плохим прогнозом ввиду повышенной инфильтрирующей способности, более активного роста и метастазирования. Однако экспрессия TP необходима для обеспечения лечебного эффекта 5-фторурацила. Таким образом, несмотря

на то, что TP является маркером неблагоприятного течения заболевания и ангиогенного потенциала опухоли, она также служит маркером для назначения антиангиогенных препаратов и активатором 5-фторурацила [33].

В целом развитие этой области клинической онкологии в последние годы несколько приостановилось. Во-первых, 5-фторурацил и его производные стали значительно реже применяться в режиме монотерапии, соответственно, при ответе опухоли на назначение комбинации препаратов становится затруднительным выявить, какой из компонентов лекарственной схемы оказал решающее влияние на успех лечения. Во-вторых, большинство исследователей предпочитают использовать для определения уровня экспрессии DPD, TS и других молекул наиболее простой и доступный метод — иммуногистохимию, которая отличается плохой межлабораторной воспроизводимостью за счет вариации применяемых антител и субъективности при оценке интенсивности окрашивания [29].

Препарат иринотекан — ингибитор топоизомеразы I — в свое время внес существенный вклад в успех лечения колоректального рака, однако продемонстрировал значительную популяционную вариабельность в отношении переносимости терапии. Дополнительные исследования установили, что одним из главных параметров, детерминирующих выраженность побочных эффектов при назначении иринотекана, является полиморфизм гена *UGT1A1*. Этот ген характеризуется популяционным разнообразием в отношении количества динуклеотидных повторов тимидин-аденин в промоторной (регуляторной) области гена. Подавляющее большинство исследователей сходятся на том, что присутствие вариантных аллелей гена *UGT1A1* сопряжено с повышенной токсичностью иринотекана. Имеется небольшое число работ, посвященных изучению не столько переносимости этого препарата, сколько анализу детерминант чувствительности рака толстого кишечника к нему [34]. В частности, целый ряд предклинических и клинических наблюдений свидетельствует о том, что вероятность ответа на иринотекан может быть ассоциирована с внутриопухолевым уровнем экспрессии его мишени — топоизомеразы I. К сожалению, немногочисленность подобных исследований и разнородность методик определения статуса топоизомеразы I не позволяют сделать окончательных выводов по данному вопросу [29].

Оксалиплатин по своей эффективности сопоставим с иринотеканом и в большинстве случаев может являться его альтернативой при планировании лечения. В нашей стране он применяется несколько чаще иринотекана — подобные предпочтения со стороны пациентов и врачей связаны с более низким риском алопеции и тяжелой диареи. Тем не менее именно выбор между оксалиплатином и иринотеканом представляется наглядным примером клинических ситуаций, когда анализ предиктивного маркера мог бы оказаться решающим звеном в определении тактики лечения.

Значительное число публикаций посвящено перспективности использования экспрессионного статуса ERCC1 — фермента репарации ДНК. Считается, что низкий уровень ERCC1 ассоциирован с большей вероятностью ответа на лечение, поскольку данный фермент может участвовать в восстановлении ДНК-аддуктов, образованных в результате действия платиносодержащих препаратов [35]. Тем не менее работы в данной области сталкиваются с такими же трудностями, как и исследования по применению фторпириридинов [36].

Подробный анализ экспрессии генов позволяет создавать тест-системы для прогноза течения болезни и обоснования выбора препаратов. Так, для рака молочной железы известны несколько коммерческих тест-систем: Oncotype DX (Genomic Health, США), Prosigna (PAM 50, NanoString Technologies, США), EndoPredict (Myriad Genetics, США) и MammaPrint (Agendia, Нидерланды). Данные тест-системы разработаны для ранних стадий заболевания (степень I, II) и преимущественно для гормонположительных опухолей. С помощью тест-систем можно проанализировать от 21 до 70 генов, отражающих степень злокачественности опухоли, наличие рецепторов к гормонам и мишеней для назначения таргетной терапии [37]. Однако значимость данных исследований пока оценивается неоднозначно, поскольку большинство пациентов имеют промежуточный риск по шкале оценки, что не вносит ясности при выборе и обосновании лечения. Клинические данные пока также неоднозначны. Тем не менее разработки подобных тест-систем ведутся и для других типов рака, включая колоректальный. В настоящее время исследуется клиническая значимость основных генов, вовлеченных в канцерогенез при колоректальном раке [38, 39].

### Основные подходы к тестированию лекарственных препаратов на опухолевых клетках пациентов

Одним из первых подходов к реализации индивидуального подбора терапии был подбор препарата на основании результата лечения опытных животных с ксенографтом опухоли, забранной у пациента. Эта технология (patient derived xenografts, PDX) была впервые описана еще в 1969 г. [40]. Суть ее состоит в том, что небольшие фрагменты опухоли, полученной от пациента в ходе хирургической операции, трансплантируют иммунодефицитным мышам. Выращенные у таких мышей опухоли далее перевиваются таким же иммунодефицитным мышам-реципиентам, которые подвергаются лечению тем или иным химиопрепаратом. Терапевтический ответ оценивается по общепринятой методике — по торможению роста опухоли. Важно, что PDX-модели, как правило, сохраняют молекулярные особенности, клеточную и патоморфологическую структуру исходных опухолей пациентов [41–43]. Более того, цитогенетический анализ опухолевых

клеток, выделенных из PDX, выявляет значительное сходство генетического профиля и профиля экспрессии генов у PDX и исходных опухолей пациентов [44–46]. PDX-модели были получены для различных типов солидных опухолей. Доказано, что лекарственный ответ PDX хорошо коррелирует с клиническим ответом у больных [47–50]. Оценка приблизительно 300 случаев для 13 типов опухолей показала хорошее соответствие между клиническим ответом пациента и терапевтическим ответом PDX — от 70 до 100%.

Хотя модели PDX обладают явными преимуществами, существует ряд ограничений, которые не позволяют широко использовать их в персонализированной медицине. Так, для приживления ксенотрансплантата опухоли требуется очень длительный период времени, обычно 4–8 мес [51–53], и дополнительное время для создания дочерних опухолевых ксенографтов с целью тестирования терапевтических режимов на мышах. Кроме того, частота прививаемости PDX у мышей для большинства типов рака обычно не превышает 50%, а для рака молочной железы, рака простаты и рака почек эта цифра существенно ниже [54–56]. Сами высокоиммунодефицитные мыши дорогостоящи, требуют специальных особо чистых условий содержания и высокой квалификации персонала. Так что, несмотря на относительный успех данного метода, он является одним из наиболее дорогих, трудозатратных и долгих по времени выполнения, что делает его неприемлемым для использования на практике [57].

Указанная ситуация обуславливает острую необходимость в быстрых и надежных альтернативных методах оценки чувствительности опухолей пациентов к лекарственным средствам. В данном вопросе большое внимание уделяется разработке методов определения химиочувствительности опухолевых клеток на выделенном из опухоли материале *in vitro*.

Известно, что линии раннего пассажа, полученные из опухоли пациента, лучше отражают свойства опухолей, чем коммерческие клеточные линии, а значит, могут более точно предсказать химиочувствительность конкретной опухоли [58]. Получение культуры раковых клеток из опухоли представляет собой сложную задачу из-за частой контаминации первичного материала и более быстрого роста стромальных клеток по сравнению с опухолевыми [59, 60]. На сегодняшний день успех в раскультировании большинства солидных опухолей достигается только в 10–40% случаев [60, 61].

Основными способами получения временных опухолевых культур является прямое раскультирование тканей опухоли (кусочками или клеточными взвесями) и метод ксенографтов, где в качестве первичного реципиента опухолевых клеток выступает организм животного [60, 62]. К значительному недостатку последнего метода относится нежелательная селекция опухолевых клеток в организме животного, а данные о химиочувствительности для таких клеток могут значительно отличаться от исходной популяции. В связи

с этим наиболее подходящей для оценки первичной химиочувствительности является методика прямого раскультирования опухолевых клеток.

В соответствии с методикой прямого раскультирования материал для культивирования получают при соблюдении асептических условий путем вырезания соответствующих кусочков опухолей, обращая внимание на сохранение клеточных элементов в жизнеспособном состоянии. Ткань для культивирования должна быть лишена некротических участков, по возможности стерильна и достаточно богата теми клетками, которые предполагается культивировать. Кусочки нарезают на мелкие частицы размером 1–3 мм в диаметре, которые помещают в питательную среду [60]. Одним из вариантов является получение по возможности однородных клеточных взвесей из образца опухолевой ткани [62]. В последнее время для получения клеточных взвесей пользуются одним или несколькими ферментами (трипсин, либераз, коллагеназа) в зависимости от типа ткани. Собранные порции клеточной взвеси освобождают промывкой от ферментов и центрифугируют в градиенте фиколла для освобождения от сопутствующих клеточных фракций. Очищенные таким образом клетки ресуспандируют в питательной среде и переносят в точно дозированном количестве в соответствующую посуду [62]. Эта методика дает возможность получать массы живых клеток без примеси стромы. Далее полученные опухолевые клетки культивируются стандартным способом (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, влажная атмосфера) в культуральных флаконах. Непосредственно для анализа тех или иных показателей опухолевые клетки рассеиваются в культуральные чашки или планшеты.

Не последнюю роль в развитии опухоли и ее устойчивости к химиотерапевтическому воздействию играет межклеточное вещество. В основном это коллаген, а также ламинин и фибронектин. Так, было показано, что выживаемость клеток при воздействии таких препаратов, как цисплатин, 5-фторурацил и эпирубицин, при проведении исследований на децеллюляризированной опухолевой строме была на 20–60% выше, чем на пластике [63]. Поэтому в тест-системы для определения химиочувствительности опухолевых клеток часто вводят внеклеточный матрикс, например коллаген. С 1990-х гг. XX в. развивается метод оценки химиочувствительности опухолевых клеток с помощью так называемой клеточной культуры, заключенной в коллагеновую каплю [64]. Данная методика дополняет трехмерную модель опухоли применением коллагена в качестве межклеточного вещества. При использовании метода клеточной культуры в коллагеновой капле оценивают увеличение/уменьшение объема опухолевого сфероида относительно контроля при воздействии химиопрепаратов по серии просветных изображений, полученных с помощью микроскопа [64, 65]. В настоящее время активно ведется валидация данной методики, в том числе для колоректального рака [65].

Как известно, опухоль имеет сложную гетерогенную

структуру и состоит из разных типов клеток, которые взаимодействуют друг с другом и опухолевым микроокружением. Клетки стромы являются активными участниками канцерогенеза и вносят свой вклад в формирование и проявление отличительных признаков опухоли, а также участвуют в развитии устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии [66]. Поэтому важной задачей для персонализированного скрининга является анализ лекарственной чувствительности не только на выделенных клеточных культурах, но и на более сложных 3D-моделях *in vitro*, содержащих разные типы клеток. В качестве таких 3D-культур рассматривают несколько основных вариантов.

1. Органоиды опухоли, которые представляют собой трехмерную культуру раковых клеток, полученных от пациента, культивируемых в виде сфероидов. Органоиды отражают межклеточные взаимодействия, а также взаимодействия клеток и внеклеточного матрикса. На основе органоидов предлагаются высокопроизводительные способы тестирования (скрининга) лекарств, которые могут предсказать реакцию опухоли пациента на терапию [67–70].

2. Опухолевая ткань, измельченная путем микродиссекции и поддерживаемая в культуральных условиях. В этом случае подготовка ткани включает механическую фрагментацию биопсийного образца, которая, однако, может вызвать локальное повреждение ткани, но в то же время сохраняет иммунологический профиль [71, 72].

3. Органотипические срезы (слайсы) опухолевой ткани, поддерживаемые в культуральных условиях. Слайсы представляют собой срезы, или пластинки, опухолевой ткани толщиной 300–500 мкм, полученные из первичной опухоли и помещенные в питательную среду [73]. Культивируемые срезы хорошо отражают микроокружение опухоли, методика их получения достаточно проста, не занимает много времени и может быть применена при большинстве солидных опухолей [74–76]. Показано, что при культивировании до 7 сут слайсы сохраняют морфологические свойства опухоли [74]. Для рака молочной железы и поджелудочной железы продемонстрирована корреляция результатов лечения пациентов и тестирования препаратов на слайсах опухоли пациентов [73, 77]. Недавно был достигнут успех в исследовании лекарственного воздействия на опухолевые слайсы, полученные из ксенографтов опухоли пациентов, выращенных на экспериментальных животных [78].

При анализе рассмотренных трехмерных *in vitro* моделей опухолей можно сделать вывод о том, что главной их проблемой является недолгосрочное поддержание в культуре из-за диффузного типа питания, отсутствия васкуляризации и циркуляции веществ, некрозов и гипоксии, возникающих в центральной части 3D-структуры. Более того, в настоящий момент нет стандартизованных систем с оптимально подобранными условиями культивирования, с помощью которых можно было бы осуществлять высокопроизводи-

тельный скрининг противоопухолевых препаратов в больших масштабах. Большой потенциал в решении данных вопросов имеют микрофлюидные системы, которые позволяют вывести трехмерные модели ткани на следующий уровень.

Микрофлюидные системы, или чипы, представляют собой устройства для культивирования клеток и тканей, состоящие из оптически прозрачного пластика, стекла или гибких полимеров, например полидиметилсилоксана (polydimethylsiloxane, PDMS), с полыми камерами, к которым присоединена система каналов и насосов для перфузии, контроля и поддержания заданных условий микросреды [79]. Название «чипы» эти системы получили из-за технологии производства, с помощью которой изначально изготавливали компьютерные микрочипы [80]. Микрофлюидные системы могут быть использованы для культивирования клеточного монослоя, сфероидов, органоидов или *ex vivo* тканевых срезов как по отдельности, так и в комбинации [81–83]. Более сложные чипы объединяют в себе несколько типов клеток и тканей, которые могут быть соединены непосредственно через пористую мембрану, покрытую компонентами внеклеточного матрикса. Жизнеспособность клеток и тканей способна поддерживаться в течение продолжительного времени (от недель до месяцев) за счет контроля параметров микроокружения и потоков перфузионной жидкости (температура, pH, питательные вещества и ростовые факторы, механические сигналы, обусловленные давлением и потоком жидкости). Кроме того, была показана возможность выстилки каналов эндотелиальными клетками человека и замены культуральной среды цельной кровью с целью исследования активации эндотелия, адгезии тромбоцитов, образования фибринового сгустка в ответ на моноклональное антитело против CD40L, предназначенного для лечения аутоиммунных нарушений [84]. В настоящее время микрофлюидные системы начинают активно использоваться фармацевтическими компаниями и отдельными исследовательскими группами по всему миру в качестве инструмента для разработки противоопухолевых препаратов, анализа химиорезистентности и действия комбинаторной противоопухолевой терапии, исследования процессов инвазии и метастазирования [85].

В.А. Hassell и соавт. [86] создали *in vitro* модель немелкоклеточного рака легкого человека в микрофлюидном чипе, которая воспроизводила рост опухоли в микроокружении, характерном для легкого, и демонстрировала ответ на терапию ингибиторами протеинкиназ, который ранее наблюдался только в *in vivo* исследованиях. Чип имел две дополнительные боковые камеры, с помощью которых можно было имитировать физиологические движения дыхания за счет циклического всасывания. Это всасывание ритмично деформировало гибкие боковые стенки и горизонтальную мембрану с опухолевыми и эпителиальными клетками. Использование функций механического приведения в действие этой системы выявило ранее

неизвестную устойчивость клеток рака легкого, несущих две мутации *EGFR* (L858R и T790M), к ингибиторам тирозинкиназ первого и третьего поколения — эрлотинибу и рокилетинибу. При культивировании в обычных статических условиях культура проявляла высокую чувствительность к рокилетинибу в достаточно малых концентрациях (полуингибирующая концентрация  $IC_{50}$  — 1 нМ) и незначительную чувствительность к эрлотинибу ( $IC_{50}$  — 100 нМ). При механических движениях, имитирующих дыхательную функцию, та же культура была практически полностью устойчива к обоим препаратам. Авторы сделали вывод о том, что такая устойчивость, связанная с дыхательными движениями, по-видимому, опосредована изменениями в передаче сигналов через рецептор *EGFR* и *MET* протеинкиназу. Эти результаты дают потенциальное объяснение высокого уровня резистентности к терапии онкологических больных с минимальной остаточной болезнью в областях легкого, которые остаются функционально аэрированными и подвижными [86].

В работе Y. Choi и соавт. [87] были воссозданы трехмерная структурная организация и микроокружение рака молочной железы. Авторы проводили совместное культивирование сфероидов рака молочной железы с эпителиальными клетками протоков молочной железы и фибробластами в геле, которые имитировали эпителиальный и стромальный компартменты. На периферии сфероидов наблюдались смешанные популяции активно пролиферирующих опухолевых и нормальных эпителиальных клеток, однако этот рост был ограничен эпителиальным компартментом и не приводил к инвазии опухолевых клеток в нижележащую строму с фибробластами. Под воздействием паклитаксела диаметр сфероидов оставался неизменным или незначительно уменьшался. Такая система предоставляет новые возможности для моделирования и исследования структурной и функциональной ассоциации опухолевых клеток с другими типами клеток в молочном протоке и стромальном компартменте, которые играют критическую роль в прогрессировании и метастазировании рака молочной железы.

Существуют и более сложные модели на чипах, содержащие *ex vivo* образцы тканей. S. Shim и соавт. [83] моделировали связи между опухолью и лимфатическим узлом, чтобы проверить, может ли модель двух органов на чипе воссоздать ключевые признаки индуцированной опухолью иммуносупрессии. Срезы мышино-лимфатического узла культивировали совместно со срезами опухоли или здоровой ткани на чипе с рециркулирующими средами, затем анализировали их способность реагировать на стимуляцию Т-клеток. В модели «лимфатический узел–опухоль» срезы лимфатических узлов оказались более иммуносупрессивными, чем в модели «лимфатический узел–здоровая ткань», что позволяет сделать вывод о возможности успешного моделирования некоторых особенностей взаимодействия опухоли и иммунитета с помощью микрофлюидных систем.

Жизнеспособность клеток в клеточной культуре при воздействии лекарственных препаратов оценивают, используя основные стандартные методики. К ним относятся МТТ-тест — колориметрический тест, основанный на восстановлении тетразолиевого красителя в нерастворимый формазан, который имеет пурпурное окрашивание, и люминесцентный тест, позволяющий оценивать количество АТФ по протеканию люциферин-люциферазной реакции. Данные подходы требуют получения большого количества клеточного материала, что не всегда возможно при работе с образцами, взятыми от пациентов. В качестве нового перспективного метода оценки раннего ответа опухолевых клеток на лекарственный препарат рассматривается анализ метаболизма при помощи флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных метаболических кофакторов [88–90]. В ряде работ показано, что метаболические изменения предшествуют морфологическим проявлениям клеточной гибели под действием лекарственных препаратов [91–93], а метаболическая гетерогенность на клеточном уровне коррелирует с клиническим ответом опухоли [94].

В США имеются две коммерческие системы для определения лекарственной чувствительности опухолевых клеток: MiCK (DiaTech Oncology), основанная на определении апоптоза в клетках после воздействия препаратов *in vitro* [95, 96], и ChemoFx (Precision Therapeutics), основанная на определении количества живых клеток с помощью нуклеарного красителя DAPI в конечной точке исследования [97]. Клинические данные с использованием этих тест-систем пока немногочисленны и недостаточны для их однозначной рекомендации к применению.

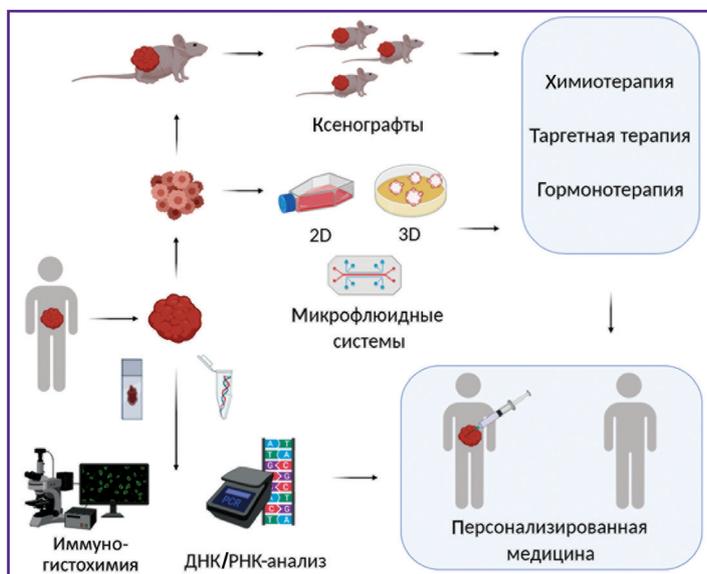
Анализ лекарственной чувствительности опухолевых клеток, изолированных из опухоли пациента, на основании нескольких критериев оценки, полученных независимыми методами с одного и того же образца, — перспективный подход к решению задачи по индивидуализации и повышению эффективности химиотерапии. Но в целом в задаче по оценке клеточного ответа на тестируемый препарат наиболее сложным вопросом остается само получение из опухолей пациента необходимого числа клеток, пригодных для анализа, и поддержание их в жизнеспособном состоянии в течение времени, нужного для проведения лечения и развития ответа на него.

## Заключение

Обзор современных исследований показал острую необходимость разработки методов индивидуализации лекарственной терапии и внедрения их в клинику. Очевидно, что такие методы должны предсказывать клинический ответ максимально точно, реализовываться с минимальными затратами и в разумные сроки.

В индивидуальном подборе лекарственного лечения рака можно выделить два глобальных подхода:

- 1) прогнозирование эффективности химиопрепара-



**Основные подходы к тестированию лекарственной чувствительности опухолей пациентов**

тов и таргетных препаратов на основе молекулярно-генетического анализа опухоли;

2) прямое тестирование лекарственной чувствительности опухоли путем воздействия препаратом на опухолевые клетки, изолированные из опухоли и поддерживаемые в жизнеспособном состоянии в лабораторных условиях (см. рисунок).

Первый подход уже зарекомендовал себя при подборе препаратов и их комбинаций, наиболее эффективных в отношении опухоли конкретного пациента с учетом ее молекулярно-генетических особенностей. Более того, известные молекулярные механизмы, участвующие в канцерогенезе и прогрессировании опухоли, могут также стать терапевтической мишенью для таргетной терапии. Продолжается поиск молекулярных маркеров, достоверно коррелирующих с терапевтическим ответом опухоли.

В качестве перспективного подхода к персонализированной терапии рассматривается подбор лекарственных препаратов на выделенном из опухоли материале на основе прямой оценки эффективности воздействия на опухолевые клетки. Усилия ученых во всем мире направлены на оптимизацию методик работы с послеоперационным или биопсийным материалом опухоли, с тем чтобы как можно дольше сохранить ткань или выделенные из нее клетки жизнеспособными и в то же время предельно полно моделировать или сохранять условия опухолевого микроокружения, фенотипические и генотипические характеристики исследуемых клеток. Выделенные из опухоли клетки или срезы опухолевой ткани, поддерживаемые в культуральных условиях, признаны наиболее релевантными объектами для проведения подобных исследований.

Актуальной задачей в области тестирования лекарственной чувствительности опухолей является

также поиск критериев клеточного ответа. Многочисленные данные свидетельствуют о высоком уровне опухолевой гетерогенности по различным параметрам — от генетических до морфологических, что предположительно определяет разнородный ответ опухолей пациентов на одну и ту же терапию. Традиционные способы оценки выживаемости клеток, типа МТТ-теста или специфической окраски для определения клеточной гибели либо пролиферации, не отражают гетерогенность на клеточном уровне. В качестве нового метода оценки гетерогенного ответа на терапию рассматривается метаболический имиджинг с помощью флуоресцентной время-разрешенной микроскопии эндогенных флуорофоров.

Следует заключить, что наиболее полное определение лекарственной чувствительности конкретной опухоли может быть достигнуто путем комбинированного применения молекулярно-генетического анализа и прямой оценки ответа выделенных клеток пациента на препараты,

входящие в протоколы лечения. Это позволит повысить эффективность лекарственной терапии и снизить риск развития побочных эффектов за счет назначения пациенту препаратов, высокоактивных в отношении его опухоли.

**Вклад авторов:** И.Н. Дружкова — написание разделов о молекулярно-генетическом анализе, тестировании лекарств на опухолевых клетках пациентов; М.В. Ширманова — написание введения, заключения, раздела о модели PDX, подготовка рисунка; Д.С. Кузнецова — написание раздела о молекулярно-генетическом анализе, подготовка рисунка; М.М. Лукина — написание разделов о химиотерапии, методах тестирования препаратов; Е.В. Загайнова — обсуждение, редактирование.

**Финансирование исследования.** Работа проведена в рамках государственного задания на выполнение экспериментальной научной разработки Приволжского исследовательского медицинского университета по теме «Создание тест-системы для определения индивидуальной лекарственной чувствительности опухоли пациентов».

**Конфликт интересов** отсутствует.

#### Литература/References

1. DeVita V.T. Jr., Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68(21): 8643–8653, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>.
2. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: a review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (review). *Int J Oncol* 2019; 54(2): 407–419.
3. Chabner B.A., Roberts T.G. Jr. Timeline: chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(1): 65–72, <https://doi.org/10.1038/nrc1529>.

4. Федянин М.Ю., Гладков О.А., Гордеев С.С., Рыков И.В., Трякин А.А., Чёрных М.В. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака прямой кишки. *Злокачественные опухоли: практические рекомендации RUSSCO #3s2* 2018; 8: 325–362.
- Fedyanin M.Yu., Gladkov O.A., Gordeev S.S., Rykov I.V., Tryakin A.A., Chernykh M.V. Practical recommendations for the treatment of colorectal cancer. *Zlokachestvennye opukholi: prakticheskie rekomendatsii RUSSCO #3s2* 2018; 8: 325–362.
5. Федянин М.Ю., Гладков О.А., Гордеев С.С., Рыков И.В., Трякин А.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения. *Злокачественные опухоли: практические рекомендации RUSSCO #3s2* 2018; 8: 289–324.
- Fedyanin M.Yu., Gladkov O.A., Gordeev S.S., Rykov I.V., Tryakin A.A. Practical recommendations for the treatment of colorectal cancer and rectosigmoid compounds. *Zlokachestvennye opukholi: prakticheskie rekomendatsii RUSSCO #3s2* 2018; 8: 289–324.
6. Padma V.V. An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei)* 2015; 5(4): 19, <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0019-4>.
7. Goossens N., Nakagawa S., Sun X., Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res* 2015; 4(3): 256–269, <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04>
8. Michor F., Polyak K. The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(11): 1361–1364, <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0234>.
9. Visvader J.E. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; 469(7330): 314–322, <https://doi.org/10.1038/nature09781>.
10. Stanta G., Bonin S. Overview on clinical relevance of intra-tumor heterogeneity. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5: 85, <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00085>.
11. Wang X., Zhang H., Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist* 2019; 2: 141–160, <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>
12. Hammond W.A., Swaika A., Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol* 2016; 8(1): 57–84, <https://doi.org/10.1177/1758834015614530>.
13. Sommerová L., Michalová E., Hrstka R. New approaches for chemosensitivity testing in malignant diseases. *Clin Onkol* 2018; 31(2): 117–124, <https://doi.org/10.14735/amko2018117>.
14. Moiseyenko V.M., Moiseyenko F.V., Yanus G.A., Kuligina E.S., Sokolenko A.P., Bizin I.V., Kudriavtsev A.A., Aleksakhina S.N., Volkov N.M., Chubenko V.A., Kozyreva K.S., Kramchaninov M.M., Zhuravlev A.S., Shelekhova K.V., Pashkov D.V., Ivantsov A.O., Venina A.R., Sokolova T.N., Preobrazhenskaya E.V., Mitiushkina N.V., Togo A.V., Iyevleva A.G., Imyaninov E.N. First-line cetuximab monotherapy in KRAS/NRAS/BRAF mutation-negative colorectal cancer patients. *Clin Drug Investig* 2018; 38(6): 553–562, <https://doi.org/10.1007/s40261-018-0629-1>.
15. Yanus G.A., Belyaeva A.V., Ivantsov A.O., Kuligina E.S., Suspitsin E.N., Mitiushkina N.V., Aleksakhina S.N., Iyevleva A.G., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Gorodnova T.V., Strelkova T.N., Efremova S.A., Lepenchuk A.Yu., Ochir-Garyaev A.N., Paneyah M.B., Matsko D.E., Togo A.V., Imyaninov E.N. Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients. *Med Oncol* 2013; 30(3): 686, <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0686-5>.
16. Sexton R.E., Mpilla G., Kim S., Philip P.A., Azmi A.S. Ras and exosome signaling. *Semin Cancer Biol* 2019; 54: 131–137, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.02.004>.
17. Владимирова Л.Ю., Абрамова Н.А., Сторожакова А.Э. Таргетная терапия анти-EGFR моноклональными антителами в лечении колоректального рака. *Злокачественные опухоли* 2016; 4-S1: 87–91.
- Vladimirova L.Yu., Abramova N.A., Storozhakova A.E. Targeted anti-EGFR monoclonal antibody therapy for colorectal cancer. *Zlokachestvennye opukholi* 2016; 4-S1: 87–91.
18. Oliner K., Douillard J.Y., Siena S., Tabernero J., Burkes R.L., Hamblet M.E.B., Bodoky G., Cunningham D., Jassem J., Rivera F., Kocáková I., Ruff P., Blasinska-Morawiec M., Smakal M., Williams R.T., Rong A., Wizezorek J.S., Sidhu R., Patterson S.D. Analysis of KRAS/NRAS and BRAF mutations in the phase III PRIME study of panitumumab (pmab) plus FOLFOX versus FOLFOX as first-line treatment (tx) for metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2013; 35(15): 3511, [https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.15\\_suppl.3511](https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.3511).
19. Schwartzberg L.S., Rivera F., Karthaus M., Fasola G., Canon J.-L., Go H.Y.Y. PEAK (study 20070509): a randomized phase II study of mFOLFOX6 with either panitumumab (pmab) or bevacizumab (bev) as first-line (tx) in patients (pts) with unresectable wild type (WT) KRAS metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2013; 31(4): 446, [https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.4\\_suppl.446](https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.4_suppl.446).
20. Van Cutsem E., Lenz H.J., Köhne C.H., Heinemann V., Tejpar S., Melezínek I., Beier F., Stroh C., Rougier P., van Krieken J.H., Ciardiello F. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(7): 692–700, <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4812>.
21. De Roock W., Claes B., Bernasconi D., Schutter J.D., Beismans B., Founzilas G., Kalogeris K.T., Kotoula V., Papamichael D., Laurent-Puig P., Penault-Llorca F., Rougier P., Vincenzi B., Santini D., Tonini G., Cappuzzo F., Frattini M., Molinari F., Saletti P., De Dosso S., Martini M., Bardelli A., Siena S., Sartore-Bianchi A., Tabernero J., Macarulla T., Di Fiore F., Gangloff A.O., Ciardiello F., Pfeiffer P., Qvortrup C., Hansen T.P., Van Cutsem E., Piessevaux H., Lambrechts D., Delorenzi M., Tejpar S. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol* 2010; 1(8): 753–762, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70130-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70130-3).
22. Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartore-Bianche A., Arena S., De Dosso P.S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(35): 5705–5712, <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.0786>.
23. Федянин М.Ю., Трякин А.А., Тюлядин С.А. Перспективы лечения больных раком толстой кишки с мутацией в гене BRAF. *Онкологическая колопроктология* 2014; 3: 9–16.
- Fedyanin M.Yu., Tryakin A.A., Tjulandin S.A. Promises for treating colon cancer patients with BRAF gene mutation. *Onkologicheskaya koloproktologiya* 2014; 3: 9–16.
24. Tariq K., Tariq K., Ghias K., Ghias K. Colorectal cancer

carcinogenesis: a review of mechanisms. *Biol Med* 2016; 13(1): 120–135, <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2015.0103>.

25. Федянин М.Ю., Трякин А.А., Тюляндин С.А. Роль микросателлитной нестабильности при раке толстой кишки. *Онкологическая колопроктология* 2012; 3: 19–25.

Fedyanin M.Y., Tryakin A.A., Tjulandin S.A. Role of microsatellite instability in colon cancer. *Onkologicheskaya koloproktologiya* 2012; 3: 19–25.

26. Roth A., Tejpar S., Delorenzi M., Yan P., Fiocca R., Klingbiel D., Dietrich D., Biesmans B., Bodoky G., Barone C., Aranda E., Nordlinger B., Cisar L., Labianca R., Cunningham D., Van Cutsem E., Bosman F. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2009; 28: 466–474, <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.3452>.

27. Heinemann V., Rivera F., O'Neil B.H., Stintzing S., Koukakis R., Terwey J.H., Douillard J.Y. A study-level meta-analysis of efficacy data from head-to-head first-line trials of epidermal growth factor receptor inhibitors versus bevacizumab in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2016; 67: 11–20, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.07.019>.

28. Price T., Kim T.W., Li J., Cascinu S., Ruff P., Suresh A.S., Thomas A., Tjulandin S., Guan X., Peeters M. Final results and outcomes by prior bevacizumab exposure, skin toxicity, and hypomagnesaemia from ASPCCCT: randomized phase 3 non-inferiority study of panitumumab versus cetuximab in chemorefractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2016; 68: 51–59, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.08.010>.

29. Имянитов Е.Н. Стандартные и потенциальные предиктивные маркеры при опухолях желудочно-кишечного тракта. *Практическая онкология* 2012; 13(4): 219–228.

Imjanitov E.N. Standard and potential predictive markers for gastrointestinal tumors. *Prakticheskaja onkologija* 2012; 13(4): 219–228.

30. Lenz H.J. Pharmacogenomics and colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* 2006; 587: 211–231, [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5133-3\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5133-3_18).

31. Lurje G., Manegold P.C., Ning Y., Pohl A., Zhang W., Lenz H.J. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(5): 1000–1007, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0219>.

32. Ye D.J., Zhang J.M. Research development of the relationship between thymidine phosphorylase expression and colorectal carcinoma. *Cancer Biol Med* 2013; 10(1): 10–15, <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2013.01.002>.

33. Yoon Y.S., Kim J.C. Recent applications of chemosensitivity tests for colorectal cancer treatment. *World J Gastroenterol* 2014; 20(44): 16398–16408, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16398>.

34. Ikeguchi M., Arai Y., Maeta Y., Ashida K., Katano K., Wakatsuki T. Topoisomerase I expression in tumors as a biological marker for CPT11 chemosensitivity in patients with colorectal cancer. *Surg Today* 2011; 41(9): 1196–1199, <https://doi.org/10.1007/s00595-011-4546-7>.

35. Arriagada R., Bergman B., Dunant A., Le Chevalier T., Pignon J.P., Vansteenkiste J.; International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(4): 351–360, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031644>.

36. Jensen N.F., Smith D.H., Nygård S.B., Rømer M.U., Nielsen K.V., Brønner N. Predictive biomarkers with potential of converting conventional chemotherapy to targeted therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47(3): 340–355, <https://doi.org/10.3109/0365521.2012.640835>.

37. Smith A., Farrah K. *Gene expression profiling tests for breast cancer: a rapid qualitative review*. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2019. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545134>.

38. Yang Q., Feng M., Ma X., Li H., Xie W. Gene expression profile comparison between colorectal cancer and adjacent normal tissues. *Oncology Letters* 2017; 14(5): 6071–6078, <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6915>.

39. Sun L.C., Qian H.X. Screening for implicated genes in colorectal cancer using whole genome gene expression profiling. *Molecular Medicine Reports* 2018; 17(6): 8260–8268, <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8862>.

40. Rygaard J., Povlsen C.O. Heterotransplantation of a human malignant tumor to “Nude” mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 77: 758–760.

41. Tentler J.J., Tan A.C., Weekes C.D., Jimeno A., Leong S., Pitts T.M., Arcaroli J.J., Messersmith W.A., Eckhardt S.G. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9(6): 338–350, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.61>.

42. Lawson D.A., Bhakta N.R., Kessenbrock K., Prummel K.D., Yu Y., Takai K., Zhou A., Eyob H., Balakrishnan S., Wang C.Y., Yaswen P., Goga A., Werb Z. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* 2015; 526(7571): 131–135, <https://doi.org/10.1038/nature15260>.

43. Xiao T., Li W., Wang X., Xu H., Yang J., Wu Q., Huang Y., Geradts J., Jiang P., Fei T., Chi D., Zang C., Liao Q., Rennhack J., Andreck E., Li N., Detre S., Dowsett M., Jeselsohn R.M., Liu X.S., Brown M. Estrogen-regulated feedback loop limits the efficacy of estrogen receptor-targeted breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(31): 7869–7878, <https://doi.org/10.1073/pnas.1722617115>.

44. Reyat F., Guyader C., Decraene C., Lucchesi C., Auger N., Assayag F., De Plater L., Gentien D., Poupon M.F., Cottu P., De Cremoux P., Gestraud P., Vincent-Salomon A., Fontaine J.J., Roman-Roman S., Delattre O., Decaudin D., Marangoni E. Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* 2012; 14(1): R11, <https://doi.org/10.1186/bcr3095>.

45. Zhao X., Liu Z., Yu L., Zhang Y., Baxter P., Voicu H., Gurusiddappa S., Luan J., Su J.M., Leung H.C., Li X.N. Global gene expression profiling confirms the molecular fidelity of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of medulloblastoma. *Neuro Oncol* 2012; 14(5): 574–583, <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos061>.

46. Misale S., Bozic I., Tong J., Peraza-Penton A., Lallo A., Baldi F., Lin K.H., Truini M., Trusolino L., Bertotti A., Di Nicolantonio F., Nowak M.A., Zhang L., Wood K.C., Bardelli A. Vertical suppression of the EGFR pathway prevents onset of resistance in colorectal cancers. *Nat Commun* 2015; 6: 8305, <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ncomms9305>.

47. Evans K.W., Yuca E., Akcakanat A., Scott S.M., Arango N.P., Zheng X., Chen K., Tapia C., Tarco E., Eterovic A.K., Black D.M., Litton J.K., Yap T.A., Tripathy D., Mills G.B., Meric-Bernstam F. A population of heterogeneous

breast cancer patient-derived xenografts demonstrate broad activity of PARP inhibitor in BRCA1/2 wild-type tumors. *Clin Cancer Res* 2017; 23(21): 6468–6477, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0615>.

48. Topp M.D., Hartley L., Cook M., Heong V., Boehm E., McShane L., Pyman J., McNally O., Ananda S., Harrell M., Etemadmoghadam D., Galletta L., Alsop K., Mitchell G., Fox S.B., Kerr J.B., Hutt K.J., Kaufmann S.H.; Australian Ovarian Cancer Study; Swisher E.M., Bowtell D.D., Wakefield M.J., Scott C.L. Molecular correlates of platinum response in human high-grade serous ovarian cancer patient-derived xenografts. *Mol Oncol* 2014; 8(3): 656–668, <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.01.008>.

49. Nunes M., Vrignaud P., Vacher S., Richon S., Lievre A., Cacheux W., Weiswald L.B., Massonnet G., Chateau-Joubert S., Nicolas A., Dib C., Zhang W., Watters J., Bergstrom D., Roman-Roman S., Bièche I., Dangles-Marie V. Evaluating patient-derived colorectal cancer xenografts as preclinical models by comparison with patient clinical data. *Cancer Res* 2015; 75(8): 1560–1566, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1590>.

50. George E., Kim H., Krepler C., Wenz B., Makvandi M., Tanyi J.L., Brown E., Zhang R., Brafford P., Jean S., Mach R.H., Lu Y., Mills G.B., Herlyn M., Morgan M., Zhang X., Soslow R., Drapkin R., Johnson N., Zheng Y., Cotsarelis G., Nathanson K.L., Simpkins F. A patient-derived-xenograft platform to study BRCA-deficient ovarian cancers. *JCI Insight* 2017; 2(1): e89760, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89760>.

51. Hidalgo M., Bruckheimer E., Rajeshkumar N.V., Garrido-Laguna I., De Oliveira E., Rubio-Viqueira B., Strawn S., Wick M.J., Martell J., Sidransky D. A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. *Mol Cancer Ther* 2011; 1(8): 1311–1316, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0233>.

52. Stebbing J., Paz K., Schwartz G.K., Wexler L.H., Maki R., Pollock R.E., Morris R., Cohen R., Shankar A., Blackman G., Harding V., Vasquez D., Krell J., Zacharoulis S., Ciznadija D., Katz A., Sidransky D. Patient-derived xenografts for individualized care in advanced sarcoma. *Cancer* 2014; 120(13): 2006–2015, <https://doi.org/10.1002/cncr.28696>.

53. Rubio-Viqueira B., Jimeno A., Cusatis G., Zhang X., Iacobuzio-Donahue C., Karikari C., Shi C., Danenberg K., Danenberg P.V., Kuramochi H., Tanaka K., Singh S., Salimi-Moosavi H., Bouraoud N., Amador M.L., Altiock S., Kulesza P., Yeo C., Messersmith W., Eshleman J., Hruban R.H., Maitra A., Hidalgo M. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(15): 4652–4661, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0113>.

54. Zhang X., Claerhout S., Prat A., Dobrolecki L.E., Petrovic I., Lai Q., Landis M.D., Wiechmann L., Schiff R., Giuliano M., Wong H., Fuqua S.W., Contreras A., Gutierrez C., Huang J., Mao S., Pavlick A.C., Froehlich A.M., Wu M.F., Tsimelzon A., Hilsenbeck S.G., Chen E.S., Zuloaga P., Shaw C.A., Rimawi M.F., Perou C.M., Mills G.B., Chang J.C., Lewis M.T. A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res* 2013; 73(15): 4885–4897, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4081>.

55. Lang H., Béraud C., Bethry A., Danilin S., Lindner V., Coquard C., Rothhut S., Massfelder T. Establishment of a large panel of patient-derived preclinical models of human renal cell

carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(37): 59336–59359, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10659>.

56. Moro M., Bertolini G., Caserini R., Borzi C., Boeri M., Fabbri A., Leone G., Gasparini P., Galeone C., Pelosi G., Roz L., Sozzi G., Pastorino U. Establishment of patient derived xenografts as functional testing of lung cancer aggressiveness. *Sci Rep* 2017; 7(1): 6689, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06912-7>.

57. Park H.S., Lee J.D., Kim J.Y., Park S., Kim J.H., Han H.J., Choi Y.A., Choi A.R., Sohn J.H., Kim S.I. Establishment of chemosensitivity tests in triple-negative and BRCA-mutated breast cancer patient-derived xenograft models. *PLoS One* 2019; 14(12): e0225082, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225082>.

58. Kamiyama H., Rauenzahn S., Shim J.S., Karikari C.A., Feldmann G., Hua L., Kamiyama M., Schuler F.W., Lin M.T., Beaty R.M., Karanam B., Liang H., Mullendore M.E., Mo G., Hidalgo M., Jaffee E., Hruban R.H., Jinnah H.A., Roden R.B., Jimeno A., Liu J.O., Maitra A., Eshleman J.R. Personalized chemotherapy profiling using cancer cell lines from selectable mice. *Clin Cancer Res* 2013; 19(5): 1139–1146, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2127>.

59. Mitra A., Mishra L., Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol* 2013; 31(6): 347–354, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.006>.

60. Hidalgo M., Amant F., Biankin A.V., Budinska E., Byrne A.T., Caldas C., Clarke R.B., de Jong S., Jonkers J., Mølandsmo G.M., Roman-Roman S., Seoane J., Trusolino L., Villanueva A. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 2014; 4(9): 998–1013, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>.

61. Dangles-Marie V., Pocard M., Richon S., Weiswald L.-B., Assayag F., Saulnier P., Judde J.G., Janneau J.L., Auger N., Validire P., Dutrillaux B., Praz F., Bellet D., Poupon M.F. Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer Res* 2007; 67(1): 398, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0594>.

62. Weiswald L.B., Richon S., Massonnet G., Guinebretière J.M., Vacher S., Laurendeau I., Cottu P., Marangoni E., Nemati F., Validire P., Bellet D., Bièche I., Dangles-Marie V. A short-term colorectal cancer sphere culture as a relevant tool for human cancer biology investigation. *Br J Cancer* 2013; 108(8): 1720–1731, <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.132>.

63. Senthelane D.A., Jonker T., Rowe A., Thomford N.E., Munro D., Dandara C., Wonkam A., Govender D., Calder B., Soares N.C., Blackburn J.M., Iqbal P.M., Dzobo K. The role of tumor microenvironment in chemoresistance: 3D extracellular matrices as accomplices. *Int J Mol Sci* 2018; 19(10): 2861, <https://doi.org/10.3390/ijms19102861>.

64. Kobayashi H., Tanisaka K., Kondo N., Mito Y., Koezuka M., Yokouchi H., Higashiyama M., Kodama K., Doi O., Yamada M. Development of new in vitro chemosensitivity test using collagen gel droplet embedded culture and its clinical usefulness. *Gan To Kagaku Ryoho* 1995; 22(13): 1933–1939.

65. Tanigawa N., Yamaue H., Ohyama S., Sakuramoto S., Inada T., Kodera Y., Kitagawa Y., Omura K., Terashima M., Sakata Y., Nashimoto A., Yamaguchi T., Chin K., Nomura E., Lee S.W., Takeuchi M., Fujii M., Nakajima T. Exploratory phase II trial in a multicenter setting to evaluate the clinical value of a chemosensitivity test in patients with gastric cancer

- (JACCRO-GC 04, Kubota memorial trial). *Gastric Cancer* 2016; 19(2): 350–360, <https://doi.org/10.1007/s10120-015-0506-z>.
66. Sounni N.E., Noel A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin Chem* 2013; 59(1): 85–89, <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>.
67. Pauli C., Hopkins B.D., Prandi D., Shaw R., Fedrizzi T., Sboner A., Sailer V., Augello M., Puca L., Rosati R., McNary T.J., Churakova Y., Cheung C., Triscott J., Pisapia D., Rao R., Mosquera J.M., Robinson B., Faltas B.M., Emerling B.E., Gadi V.K., Bernard B., Elemento O., Beltran H., Demichelis F., Kemp C.J., Grandori C., Cantley L.C., Rubin M.A. Personalized in vitro and in vivo cancer models to guide precision medicine. *Cancer Discov* 2017; 7(5): 462–477, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1154>.
68. Clevers H. Modeling development and disease with organoids. *Cell* 2016; 165(7): 1586–1597, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>.
69. van de Wetering M., Francies H.E., Francis J.M., Bounova G., Iorio F., Pronk A., van Houdt W., van Gorp J., Taylor-Weiner A., Kester L., McLaren-Douglas A., Blokker J., Jaksani S., Bartfeld S., Volckman R., van Sluis P., Li V.S., Seepo S., Sekhar Pedamallu C., Cibulskis K., Carter S.L., McKenna A., Lawrence M.S., Lichtenstein L., Stewart C., Koster J., Versteeg R., van Oudenaarden A., Saez-Rodriguez J., Vries R.G., Getz G., Wessels L., Stratton M.R., McDermott U., Meyerson M., Garnett M.J., Clevers H. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 2015; 161(4): 933–945, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.053>.
70. Sato T., Stange D.E., Ferrante M., Vries R.G., Van Es J.H., Van den Brink S., Van Houdt W.J., Pronk A., Van Gorp J., Siersema P.D., Clevers H. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011; 141(5): 1762–1772, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>.
71. Astolfi M., Péant B., Lateef M.A., Rousset N., Kendall-Dupont J., Carmona E., Monet F., Saad F., Provencher D., Mes-Masson A.M., Gervais T. Micro-dissected tumor tissues on chip: an ex vivo method for drug testing and personalized therapy. *Lab Chip* 2016; 16(2): 312–325, <https://doi.org/10.1039/c5lc01108f>.
72. Dohmen A.J.C., Sanders J., Canisius S., Jordanova E.S., Aalbersberg E.A., van den Brekel M.W.M., Neefjes J., Zuur C.L. Sponge-supported cultures of primary head and neck tumors for an optimized preclinical model. *Oncotarget* 2018; 9(38): 25034–25047, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25244>.
73. Naipal K.A., Verkaik N.S., Sánchez H., van Deurzen H.M., den Bakker M.A., Hoeijmakers J.H.J., Kanaar R., Vreeswijk M.P., Jager A., van Gent D.C. Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. *BMC Cancer* 2016; 16: 78, <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2119-2>.
74. Meijer T.G., Naipal C.A.T., Jager A., van Gent D.C. Ex vivo tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA* 2017; 3(2): FSO190, <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0003>.
75. Roelants C., Pillet C., Franquet Q., Sarrazin C., Peillon N., Giacosa S., Guyon L., Fontanell A., Fiard G., Long J.A., Descotes J.L., Cochet C., Filhol O. Ex-vivo treatment of tumor tissue slices as a predictive preclinical method to evaluate targeted therapies for patients with renal carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020; 12(1): 232, <https://doi.org/10.3390/cancers12010232>.
76. Unger F.T., Bentz S., Krger J., Rosenbrock C., Schaller J., Pursche K., Schaller A., Juhl H., David K.A. Precision cut cancer tissue slices in anti-cancer drug testing. *Mol Pathophysiol* 2015; 4: 108–121, <https://doi.org/10.5455/jmp.20151023055556>.
77. Roife D., Dai B., Kang Y., Perez M.V.R., Pratt M., Li X., Fleming J.B. Ex vivo testing of patient-derived xenografts mirrors the clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2016; 22(24): 6021–6030, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2936>.
78. Zhang Y., Huang W., Yang Q., Zhang H., Zhu X., Zeng M., Zhou X., Wang Z., Li W., Jing H., Zhang X., Shi Y., Hu H., Yan H., Li Z., Zhai B. Cryopreserved biopsy tissues of rectal cancer liver metastasis for assessment of anticancer drug response in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2020; 43(2): 405–414, <https://doi.org/10.3892/or.2019.7450>.
79. Valente K.P., Khetani S., Kolahchi A.R., Sanati-Nezhad A., Suleman A., Akbari M. Microfluidic technologies for anticancer drug studies. *Drug Discov Today* 2017; 22(11): 1654–1670, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.010>.
80. Novak R., Didier M., Calamari E., Ng C.F., Choe Y., Clauson S.L., Nestor B.A., Puerta J., Fleming R., Firoozinezhad S.J., Ingber D.E. Scalable fabrication of stretchable, dual channel, microfluidic organ chips. *J Vis Exp* 2018; 140: 58151, <https://doi.org/10.3791/58151>.
81. Lee I.C. Cancer-on-a-chip for drug screening. *Curr Pharm Des* 2018; 24(45): 5407–5418, <https://doi.org/10.2174/1381612825666190206235233>.
82. Kumar V., Varghese S. Ex vivo tumor-on-a-chip platforms to study intercellular interactions within the tumor microenvironment. *Adv Healthc Mater* 2019; 8(4): e1801198, <https://doi.org/10.1002/adhm.201801198>.
83. Shim S., Belanger M.C., Harris A.R., Munson J.M., Pompano R.R. Two-way communication between ex vivo tissues on a microfluidic chip: application to tumor-lymph node interaction. *Lab Chip* 2019; 19(6): 1013–1026, <https://doi.org/10.1039/c8lc00957k>.
84. Barrile R., van der Meer A.D., Park H., Fraser J.P., Simic D., Teng F., Conegliano D., Nguyen J., Jain A., Zhou M., Karalis K., Ingber D.E., Hamilton G.A., Otieno M.A. Organ-on-chip recapitulates thrombosis induced by an anti-CD154 monoclonal antibody: translational potential of advanced microengineered systems. *Clin Pharmacol Ther* 2018; 104(6): 1240–1248, <https://doi.org/10.1002/cpt.1054>.
85. Dhiman N., Kingshott P., Sumer H., Sharma C.S., Rath S.N. On-chip anticancer drug screening — recent progress in microfluidic platforms to address challenges in chemotherapy. *Biosens Bioelectron* 2019; 137: 236–254, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.070>.
86. Hassell B.A., Goyal G., Lee E., Sontheimer-Phelps A., Levy O., Chen C.S., Ingber D.E. Human organ chip models recapitulate orthotopic lung cancer growth, therapeutic responses, and tumor dormancy in vitro. *Cell Rep* 2017; 21(2): 508–516, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.043>.
87. Choi Y., Hyun E., Seo J., Blundell C., Kim H.C., Lee E., Lee S.H., Moon A., Moon W.K., Huh D. A microengineered pathophysiological model of early-stage breast cancer. *Lab Chip* 2015; 15(16): 3350–3357, <https://doi.org/10.1039/c5lc00514k>.
88. Shah A.T., Demory Beckler M., Walsh A.J., Jones W.P., Pohlmann P.R., Skala M.C. Optical metabolic imaging of treatment response in human head and neck squamous

cell carcinoma. *PLoS One* 2014; 9(3): e90746, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090746>.

89. Huang S., Heikal A.A., Webb W.W. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophys J* 2002; 82(5): 2811–2825, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75621-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75621-X).

90. Lukina M.M., Shirmanova M.V., Sergeeva T.F., Zagaynova E.V. Metabolical imaging for the study of oncological processes (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(4): 113–121, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.16>.

91. Lukina M.M., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Druzhkova I.N., Shimolina L.E., Zagaynova E.V., Shirmanova M.V. Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2018; 1862(8): 1693–1700, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.021>.

92. Lukina M.M., Dudenkova V.V., Shimolina L.E., Snopova L.B., Zagaynova E.V., Shirmanova M.V. In vivo metabolic and SHGi for monitoring of tumor response to chemotherapy. *Cytometry A* 2019; 95(1): 47–55, <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23607>.

93. Alam S.R., Wallrabe H., Svindrych Z., Chaudhary A.K., Christopher K.G., Chandra D., Periasamy A. Investigation of

mitochondrial metabolic response to doxorubicin in prostate cancer cells: an NADH, FAD and tryptophan FLIM assay. *Sci Rep* 2017; 7(1): 10451, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10856-3>.

94. Sharick J., Walsh C.M., Sprackling C.M., Pasch C.A., Pham D.L., Esbona K., Choudhary A., Garcia-Valera R., Burkard M.E., McGregor S.M., Matkowskyj K.A., Parikh A.A., Meszoely I.M., Kelley M.C., Tsai S., Deming D.A., Skala M.C. Metabolic heterogeneity in patient tumor-derived organoids by primary site and drug treatment. *Front Oncol* 2020; 10: 553, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00553>.

95. Cree I.A. Chemosensitivity and chemoresistance testing in ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21(1): 39–43, <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e32832210ff>.

96. Bosserman L.D., Rajurkar S.P., Rogers K., Davidson D.C., Chernick M., Hallquist A., Malouf D., Presant C.A. Correlation of drug-induced apoptosis assay results with oncologist treatment decisions and patient response and survival. *Cancer* 2012; 118(19): 4877–4883, <https://doi.org/10.1002/cncr.27444>.

97. Jamal B.T., Grillone G.A., Jalisi S. Chemoresponse assay in head and neck cancer patients: a three-year follow up. *J Clin Diagn Res* 2017; 11(5): XC01–XC03, <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24802.9816>.