

УДК 57.021, 576.08

ТЕСТИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОРГАНОИДАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 г. М. О. Силкина^{1,*}, А. В. Разумовская¹, С. В. Никулин^{1,2},
член-корреспондент РАН А. Г. Тоневицкий¹, Б. Я. Алексеев²

Поступило 01.12.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принято к публикации 05.12.2023 г.

Доказано, что опухолевые органоиды хорошо отражают фенотипические и генетические характеристики исходного биоматериала. Сообщалось, что результаты тестирования лекарственных препаратов на органоидных культурах могут передавать клинический ответ пациентов. В данной работе из биопсийного материала рака предстательной железы (РПЖ) была получена органоидная культура, на которой были протестированы препараты доцетаксел и энзалутамид, применяющиеся в клинической практике для лечения РПЖ. Было проведено сравнение разных способов оценки эффективности препаратов *in vitro*. Было показано, что полуингибирующая концентрация доцетаксела была значительно ниже, чем у энзалутамида. Однако при проведении эксперимента с клинически значимыми концентрациями и временами инкубации энзалутамид демонстрировал более высокую эффективность, чем доцетаксел. Таким образом, для дальнейшего применения в клинической практике важно оптимизировать условия тестирования препаратов на культурах *in vitro*.

Ключевые слова: органоиды, рак предстательной железы, доцетаксел, энзалутамид, лекарственный тест.

DOI: 10.31857/S2686738924020021, **EDN:** WGAXGU

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике ежегодно в мире регистрируется более 1.4 миллиона новых случаев рака предстательной железы (РПЖ), с уровнем смертности около 375 тысяч [1]. В 112 странах этот вид рака является наиболее часто диагностируемым среди мужчин [1]. В России РПЖ является вторым по распространенности онкологическим заболеванием среди мужчин и третьим по смертности [2].

Для лечения РПЖ в настоящее время существует несколько подходов и ряд препаратов. Выбор той или иной схемы лечения определяется главным образом уровнем прогрессии заболевания. В первую очередь при выборе стратегии лечения учитываются кастрационная чувствительность или резистентность рака предстательной железы, а также наличие или отсутствие метастазов [3]. Одними из наиболее распространенных препаратов для лечения РПЖ, используемых в клинической практике, являются препараты доцетаксел и энзалутамид. Механизм действия доцетаксела заключается в ингибировании

процесса деления клеток посредством нарушения нормальной функции микротрубочек [4]. Данный препарат используется для лечения не только разных форм РПЖ, но и других видов рака, таких как рак молочной железы, рак желудка и другие [4]. Энзалутамид является антиандрогеном, механизм его действия заключается в блокировании андрогеновых рецепторов, тем самым предотвращается важное действие гормонов, таких как тестостерон и дигидротестостерон, на клетки предстательной железы, в том числе опухолевые [5]. Энзалутамид, как и доцетаксел, демонстрирует эффективность при лечении разных видов РПЖ, таких как метастатический и неметастатический кастрационно-резистентный РПЖ, а также метастатический кастрационно-чувствительный РПЖ [6].

Учитывая разнообразие препаратов, доступных для лечения, а также проблему лекарственной устойчивости, в последнее время все большую популярность приобретают индивидуальные подходы при выборе схемы лечения. В последние годы трехмерные опухолевые органоиды, полученные от пациентов, стали популярными моделями для *in vitro* исследований в области рака [7]. Это стало возможным благодаря тому, что опухолевые органоиды эффективно сохраняют генетические и морфологические особенности исходного биоматериала пациента, позволяют достаточно легко осуществ-

¹Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

²ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр радиологии” Минздрава России, Москва, Россия

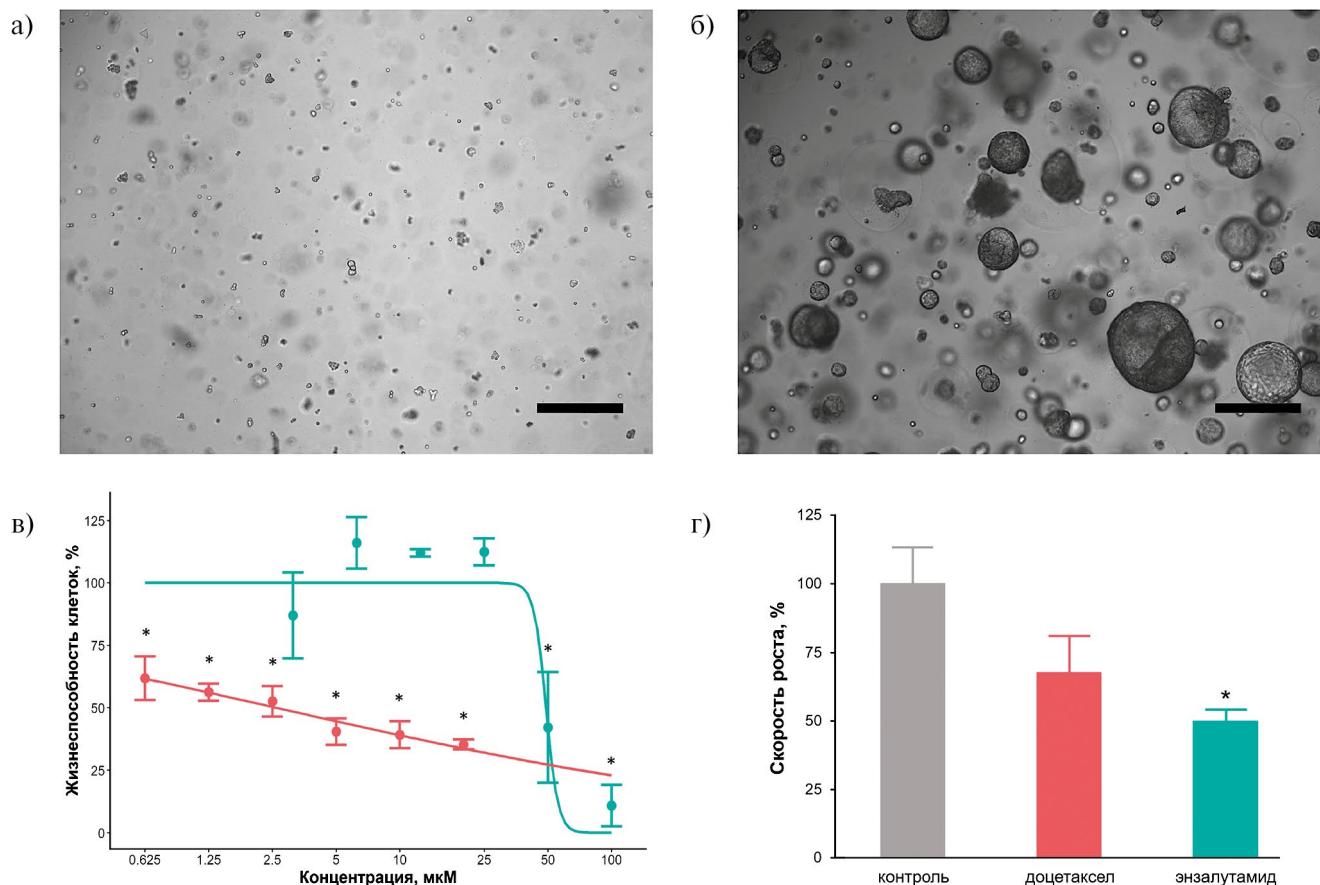
*E-mail: mosilkina@hse.ru

лять скрининг лекарственных препаратов и даже выявлять механизмы их действия [8, 9]. Также было показано, что такие культуры могут успешно использоваться для предсказания реакции пациентов на лекарственные препараты в клинической практике [10]. Все перечисленные особенности делают опухолевые органоиды, полученные от конкретных пациентов, перспективной моделью для исследования чувствительности к определенным препаратам с целью выбора индивидуально адаптированного плана лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичную органоидную культуру опухолевых клеток предстательной железы получали из опухолевой ткани по технологии, описанной ранее [11]. Перед проведением цитотоксического теста органоиды обрабатывали диссоциирующим раствором TrypLE Express, ресуспендировали, переносили в пробирку на 1.5 мл, инкубировали в термостате при 37 °C 2–3 мин, после чего добавляли равный объем DPBS, ресуспендировали, центрифугировали при

300 g 4 мин и отбирали надосадочную жидкость. К осадкам добавляли внеклеточный матрикс Matrigel и ресуспендировали клетки. Переносили по 10 мкл суспензии в лунки культурального 96-луночного планшета. Планшет помещали в клеточный инкубатор до застывания геля. После в лунки добавляли по 100 мкл питательной среды и инкубировали планшет в клеточном инкубаторе в течение 24 ч. Для оценки цитотоксического эффекта доцетаксела и энзалутамида была осуществлена титровка препаратами в диапазоне концентраций от 0.625 до 100 мкМ. Клетки после добавления тестируемых препаратов инкубировали в клеточном инкубаторе в течение 72 ч. Для оценки ингибирования скорости роста органоидов в культуральную среду добавляли доцетаксел в концентрации 5.47 мкМ, что соответствует клиническим данным по фармакокинетике [12]. Клетки инкубировались с препаратом в течение 3 ч, после чего происходила смена среды на новую, инкубацию продолжали еще в течение 72 ч. Аналогично энзалутамид добавлялся в концентрации 24.55 мкМ и инкубировался с клет-



Прижизненные микрофотографии культуры органоидов рака предстательной железы в проходящем свете, 2-й пассив сразу после пересадки (а) и через 14 дней после пересадки, отрезок масштаба 400 мкм (б), жизнеспособность органоидов после обработки доцетакселом (красный) и энзалутамидом (голубой) в диапазоне концентраций от 0.625 до 100 мкМ (в) и скорость роста органоидов после обработки доцетакселом и энзалутамидом в клинической концентрации (г), * означает статистическое различие с контролем ($p < 0.05$).

ками в течение 72 ч [13]. Эксперимент проводили в трех повторях. Для оценки жизнеспособности клеток использовали MTS-тест согласно протоколу производителя. Поглощение измеряли при помощи планшетного мультифункционального ридера SpectraMax iD3. Фоновое поглощение измеряли в лунках без клеток. Жизнеспособность рассчитывали по формуле:

$$(A - O) / (A(0) - O) \times 100\%,$$

где A — поглощение в тестовых лунках после инкубации с препаратом; $A(0)$ — поглощение в контрольных лунках после инкубации с препаратом, O — фоновое поглощение. Скорость роста рассчитывали по формуле:

$$(2^{[\log_2((A - O)/(A_0 - O))]/[\log_2((A(0) - O)/(A_0 - O))]} - 1) \times 100\%,$$

где A_0 — поглощение в лунках с клетками непосредственно перед добавлением препарата. Для оценки статистической достоверности наблюдаемых отличий использовали дисперсионный анализ (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе удалось успешно установить органоидную культуру, полученную из биопсии пациенты с РПЖ. Микрофотографии органоидов представлена на рисунке (а, б). Стоит отметить, что получение органоидных культур из опухолевых клеток предстательной железы технически является более сложным, чем для многих других типов рака [14, 15], а культивирование органоидов РПЖ зачастую ограничивается лишь несколькими пассажами [16].

Анализ жизнеспособности полученных органоидных линий при действии противоопухолевых препаратов доцетаксела и энзалутамида позволил определить концентрацию полумаксимального ингибирования (см. рисунок, в). Она составила $49.0 \pm \pm 25.8$ мкМ для энзалутамида и 2.6 ± 0.9 мкМ для доцетаксела. Отсюда следует вывод, что при применении стандартной методики оценки эффективности препаратов доцетаксел является более эффективным противоопухолевым агентом. Однако оценка скорости роста органоидных культур при действии препаратов в приближенных к клинике условиях показала, что энзалутамид ингибирует скорость роста опухолевых органоидов более эффективно, чем доцетаксел (см. рисунок, г). При этом энзалутамид замедлил скорость роста культуры практически на 50% ($p < 0.05$), в то время как доцетаксел не показал статистически значимого ингибирования. Стоит отметить, что показатель ингибирования роста считается более чувствительной метрикой, поскольку позволяет проводить измерение независимо от таких параметров, как плотность клеток или их ско-

рость роста, что может вносить искажение при измерении жизнеспособности [17].

Таким образом, органоидная культура, полученная от пациента с РПЖ, показала разную чувствительность к противоопухолевым препаратам доцетаксел и энзалутамид. Было выявлено, что доцетаксел демонстрирует практически в 10 раз меньшую концентрацию полумаксимального ингибирования по сравнению с энзалутамидом. Однако для получения релевантных для клиники результатов важно учитывать тот факт, что клиническая концентрация энзалутамида практически в 5 раз выше, чем соответствующая концентрация доцетаксела [12, 13]. Определение более чувствительной метрики, эффективности ингибирования роста, показало, что только энзалутамид в клинической концентрации статистически значимо ингибирует рост опухолевых органоидов. Таким образом, опухолевые органоиды, полученные от пациентов с РПЖ, обладают потенциалом для определения чувствительности конкретного пациента к тому или иному препарату при правильном выборе методики тестирования. Стоит отметить, что в литературе есть малочисленные сообщения о том, что результаты органоидных тестов могут соответствовать ответам пациентов с РПЖ в клинике [18]. Все это делает органоидные модели РПЖ перспективной *in vitro* системой, которая может быть полезной при определении наиболее эффективной противоопухолевой терапии для конкретного пациента.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00397).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом № 488 Московского научно-исследовательского онкологического института им. П. А. Герцена — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России от 27.03.2020. Пациент подписал информированное согласие на участие в исследовании.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung, H. Ferlay, J. Siegel R.L., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021. V. 71. № 3. P. 209–249.

2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). // Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022.
3. Grimaldi A.M., Salvatore M., and Cavaliere C. Diagnostic and prognostic significance of extracellular vesicles in prostate cancer drug resistance: A systematic review of the literature. // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2023. Vol. 26. № 2. P. 228–239.
4. Montero A., Fossella F., Hortobagyi G., et al. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. // *The Lancet Oncology*. 2005. Vol. 6. № 4. P. 229–239.
5. Scott L.J. Enzalutamide: A Review in Castration-Resistant Prostate Cancer. // *Drugs*. 2018. Vol. 78. № 18. P. 1913–1924.
6. Armstrong A.J., Szmulowitz R.Z., Petrylak D.P., et al. ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. // *Journal of Clinical Oncology*. 2019. Vol. 37. № 32. P. 2974–2986.
7. Jackson S.E., Chester J.D. Personalised cancer medicine. // *International Journal of Cancer*. 2015. Vol. 137. № 2. P. 262–266.
8. Nikulin S.V., Alekseev B.Y., Sergeeva N.S., et al. Breast cancer organoid model allowed to reveal potentially beneficial combinations of 3,3'-diindolylmethane and chemotherapy drugs // *Biochimie*. 2020. Vol. 179. P. 217–227.
9. Poloznikov A.N., Nikulin S.V., Bolotina L.V., et al. 9-ING-41, a Small Molecule Inhibitor of GSK-3 β , Potentiates the Effects of Chemotherapy on Colorectal Cancer Cells. // *Frontiers in Pharmacology*. 2021. Vol. 12. P. 1–18.
10. Verduin M., Hoebe A., De Ruyscher D., et al. Patient-Derived Cancer Organoids as Predictors of Treatment Response // *Frontiers in Oncology*. 2021. Vol. 11. P. 6491980.
11. Nikulin S. V., Alekseev B. Y., Poloznikov A. A., et al. The first experience of using prostate cancer organoids as a model for personalized selection of drugs. // *Cancer Urology*. 2023. Vol. 19, № 2. P. 41–46.
12. Liston D.R., Davis M. Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies. // *Clinical Cancer Research*. 2017. Vol. 23. № 14. P. 3489–3498.
13. Gibbons J.A., Ouatas T., Krauwinkel W., et al. Clinical Pharmacokinetic Studies of Enzalutamide. // *Clinical Pharmacokinetics*. 2015. Vol. 54. № 10. P. 1043–1055.
14. Xu H., Jiao D., Liu A., et al. Tumor organoids: applications in cancer modeling and potentials in precision medicine. // *Journal of Hematology & Oncology*. 2022. Vol. 15. № 1. P. 58.
15. Beshiri M., Agarwal S., Yin J.J., et al. Prostate organoids: emerging experimental tools for translational research. // *Journal of Clinical Investigation*. 2023. Vol. 133. № 10. P. 169616.
16. Laccetti A. L., Morris M. J., Kantoff P. W. A Clinical Evaluation of Enzalutamide in Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer: Guiding Principles for Treatment Selection and Perspectives on Research. // *OncoTargets and Therapy*. 2020. Vol. Volume 13. P. 13247–13263.
17. Hafner M., Niepel M., Chung M., et al. Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. // *Nature Methods*. 2016. Vol. 13. № 6. P. 521–527.
18. Karkampouna S., La Manna F., Benjak A., et al. Patient-derived xenografts and organoids model therapy response in prostate cancer. // *Nature Communications*. 2021. Vol. 12. № 1. P. 1117.

ASSESSING THE EFFICACY OF ANTI-CANCER DRUGS ON ORGANOID MODELS DERIVED FROM PROSTATE CANCER

M. O. Silkina^{a, #}, A. V. Razumovskaya^a, S. V. Nikulin^{a, b},
Corresponding Member of the RAS A. G. Tonevitsky^a, B. Ya. Alekseev^b

^aNational Research University “Higher School of Economics”, Moscow, Russian Federation

^bNational Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: mosilkina@hse.ru

It has been proven that tumor organoids effectively mirror the phenotypic and genetic traits of the original biomaterial. It has been noted that outcomes from drug testing in organoid cultures can accurately represent the clinical response observed in patients. In this study, an organoid culture was derived from biopsy material of prostate cancer (PC). Subsequently, clinical practice drugs, docetaxel and enzalutamide, were tested on this organoid culture. Various techniques for evaluating the efficacy of drugs in vitro were compared. The half maximal inhibitory concentration of docetaxel was found to be markedly lower compared to that of enzalutamide. However, when tested at clinically relevant concentrations and incubation times, enzalutamide was more effective than docetaxel. Therefore, it is crucial to optimize the testing conditions for drugs on in vitro cultures for their subsequent application in clinical practice.

Keywords: organoids, prostate cancer, docetaxel, enzalutamide, drug test.