

Новые подходы в 3D-моделировании роста *in vitro* первичных культур злокачественных глиом

Ю.А. Хоченкова¹, И.Г. Дырда², Ю.С. Мачкова¹, Э.Ш. Соломко¹,
Т.А. Сидорова¹, Д.А. Хоченков^{1,3}, Е.А. Авилова⁴

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 115284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

³ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет»; Россия, 445020 Тольятти, Белорусская ул., 14;

⁴ООО «ДжиИ Хэлскеа»; Россия, 123112 Москва, Пресненская набережная, 10

Контакты: Юлия Александровна Хоченкова julia_yet@bk.ru

Введение. Заболеваемость глиомами головного мозга прочно занимает лидирующую позицию среди всех опухолей центральной нервной системы — 40–50 % выявленных случаев, более половины из них представлены глиобластомой. Существующие клеточные линии и методы культивирования не отражают всех особенностей трехмерной (3D) организации нативной глиобластомы. Применение темозоломида приводит к развитию лекарственной устойчивости и острого рецидива с последующим плохим клиническим исходом. Развитие резистентности в значительной степени связано с наличием в популяции опухолевых стволовых клеток и внутриопухолевой гетерогенностью. Получение 3D-культур из первичного материала позволит сохранить пул стволовых клеток и специфические для конкретной опухоли особенности.

Цель исследования — получить 3D-модель на основе первичных клеточных культур, позволяющую сохранить гетерогенную популяцию и исходный фенотип опухолевых клеток.

Материалы и методы. Использованы клетки линии человеческой глиомы U-87MG и первичная клеточная культура GBM002, полученная из операционного материала, с подтвержденным диагнозом глиобластомы. Из клеточных линий были получены нейросферы, рост которых контролировали с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000. Для определения содержания клеток CD133+ использовали метод проточной цитометрии. Оценку экспрессии в нейросферах рецепторных тирозинкиназ VEGFR1, VEGFR2 (рецепторы эндотелиального фактора роста 1-го и 2-го типов), FGFR2 (рецептор фактора роста фибробластов 2-го типа) и маркера гипоксии HIF-1α (фактор, индуцируемый гипоксией, 1α) проводили с помощью конфокальной микроскопии.

Результаты. Клетки глиобластомы GBM002, выделенные из операционного материала, образовывали нейросферы, при этом повышалось количество клеток CD133+ с 1–2 до 16–19 % по сравнению с двухмерными культурами. При длительном культивировании клеток с нецитотоксическими дозами темозоломида установлено, что такие клетки образуют нейросферы меньшего размера по сравнению с контрольными клетками. Показано, что экспрессия рецепторных тирозинкиназ при культивировании клеток глиобластомы GBM002 в нейросферах отличается от таковой в двухмерных культурах. Установлено, что в нейросферах в значительной степени увеличивается экспрессия FGFR2 и VEGFR1.

Заключение. 3D-культивирование первичных культур позволяет получать более гетерогенную популяцию опухолевых клеток, отражающую пространственную неоднородность клеток, повышать пул стволовых клеток и воссоздавать условия гипоксии внутри микроопухолей головного мозга.

Ключевые слова: глиобластома, 3D-культура, рецепторные тирозинкиназы, темозоломид

Для цитирования: Хоченкова Ю.А., Дырда И.Г., Мачкова Ю.С. и др. Новые подходы в 3D-моделировании роста *in vitro* первичных культур злокачественных глиом. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):69–74.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-69-74

New approaches in 3D modeling of *in vitro* growth of primary cultures of malignant gliomas

Yu.A. Khochenkova¹, I.G. Dyrda², Yu.S. Machkova¹, E.Sh. Solomko¹, T.A. Sidorova¹,
D.A. Khochenkov^{1,3}, E.A. Avilova⁴

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²S.P. Botkin City Clinical Hospital; 5th Botkinskiy Proezd, Moscow 115284, Russia;

³Togliatti State University; 14 Belorusskaya St., Togliatti 445020, Russia;

⁴GE Healthcare; 10 Presnenskaya naberezhnaya, Moscow 123112, Russia

Background. The incidence of brain gliomas firmly occupies a leading position among all central nervous system tumors — 40–50 % of the cases detected, more than half of them are glioblastoma. Existing cell lines and cultivation methods do not reflect all the features of

the three-dimensional (3D) organization of native glioblastoma. The use of temozolomide leads to the development of drug resistance and acute relapse, followed by a poor clinical outcome. The development of resistance is largely associated with the presence of tumor stem cells in the population and intratumoral heterogeneity. Obtaining 3D cultures from the primary material will allow us to save the stem cell pool and tumor-specific features.

The study objective. Get a 3D model based on primary cell cultures, which allows you to save a heterogeneous population and the original phenotype of tumor cells.

Materials and methods. We used U-87MG human glioma cells and GBM002 primary cell culture obtained from surgical material with a confirmed diagnosis of glioblastoma. Neurospheres were obtained from cell lines, the growth of which was monitored using the InCell Analyzer 6000 automatic cell analysis system. Flow cytometry was used to determine the CD133+ cell content. The expression of the receptor tyrosine kinases VEGFR1, VEGFR2 (endothelial growth factor type 1 and 2 receptors), FGFR2 (fibroblast growth factor receptor type 2) and the hypoxia marker HIF-1 α (hypoxia inducible factor, 1 α) in the neurospheres was evaluated using confocal microscopy.

Results. GBM002 glioblastoma cells isolated from the surgical material formed neurospheres, while the number of CD133+ cells increased from 1–2 to 16–19 % compared with two-dimensional cultures. During long-term cultivation of cells with non-cytotoxic doses of temozolomide, it was found that such cells form smaller neurospheres compared to control cells. It was shown that the expression of receptor tyrosine kinases during cultivation of GBM002 glioblastoma cells in neurospheres differs from that in two-dimensional cultures. We found that in neurospheres, the expression of FGFR2 and VEGFR1, is significantly increased.

Conclusion. 3D cultivation of primary cultures allows one to obtain a more heterogeneous population of tumor cells that reflects the spatial heterogeneity of cells, increase the pool of stem cells and recreate hypoxia conditions inside the brain micro-tumors.

Key words: glioblastoma, 3D culture, receptor tyrosine kinases, temozolomide

For citation: Khochenkova Yu.A., Dyrda I.G., Machkova Yu.S. et al. New approaches in 3D modeling of *in vitro* growth of primary cultures of malignant gliomas. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(4):69–74. (In Russ.).

ВВЕДЕНИЕ

Глиобластома является высокоагрессивной и резистентной опухолью центральной нервной системы [1]. Несмотря на улучшения в хирургической технике и значительный прогресс в разработке различных схем химио- и лучевой терапии, медиана общей выживаемости после лечения все еще составляет около 15 мес, половину этого времени пациенты живут с прогрессирующим заболеванием [2]. Данная опухоль неоднородна по своей природе и представляет собой гетерогенную клеточную популяцию с различными биологическими свойствами и типами генетических изменений [3], что усложняет задачу по созданию доклинической модели, достоверно повторяющей соответствующие аспекты биологии глиобластомы в условиях *in vitro*.

До настоящего времени стандартные протоколы доклинических испытаний противоопухолевых лекарств в значительной степени основывались на двухмерных (2D) клеточных моделях *in vitro* или исследованиях на животных *in vivo*. Тем не менее в большинстве случаев данные, полученные на 2D-культурах, не отражают в полной мере гетерогенности опухолевого микроокружения и фенотипа родительской опухоли, из которой была получена клеточная культура. В то же время исследование на животных в силу межвидовых различий не в состоянии полностью воспроизвести возможную реакцию на лекарства у людей.

На сегодняшний день представляется актуальным применение новых методик трехмерного (3D) культивирования для поддержания первичной родительской культуры глиобластомы *in vitro*, так как эта техника обеспечивает благоприятную среду и микроокружение для роста и длительного сохранения исходного фенотипа опухоли. Было показано, что опухолевые

сфероиды более точно воспроизводят пространственную организацию, градиенты питательных веществ и способны образовывать межклеточные взаимодействия. Использование 3D-модели позволяет нам поддерживать смешанные гетерогенные популяции клеток, включая пул стволовых опухолевых клеток, что в значительной мере сопоставимо с картиной, происходящей в организме [4]. Биологические 3D-сфероиды из опухолевых клеток могут служить промежуточными системами между традиционными 2D-культурами клеток и моделями опухолей *in vivo*.

Цель исследования — изучение фенотипических характеристик первичных клеток глиобластомы человека, полученных из операционного материала, проявляющихся при культивировании в 3D-многоклеточных сфероидедах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В работе использовалась клеточная линия человеческой глиомы U-87MG (ATCC® HTB-14™, США), культивировалась согласно рекомендациям на полной питательной среде EMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Клеточная культура GBM002 с гистологически подтвержденным диагнозом глиобластомы была получена из операционного материала (ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ). Клетки культивировали на полной питательной среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), с добавлением 2 мМ/мл глутамина, 50 мг/мл пенициллин-стрептомицина (Gibco, Великобритания) при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO₂.

Для роста в 3D-культуре клетки культивировали в бессывороточной среде с добавлением 10 мл добавки

B-27 (Invitrogen, Великобритания) в присутствии 20 нг/мл основного фактора роста фибробластов (bFGF) и 20 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF) (Becton Dickinson, США).

Формирование нейросфер из клеток глиобластомы.

Клетки глиобластомы диссоциировали в суспензию отдельных клеток с использованием TripleSelect (Gibco, Великобритания), отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и ресуспендировали в питательной среде. Для формирования сфероидов клетки (1×10^3 клеток на лунку) высаживали на 96-луночные сфероидальные микропланшеты (Corning, США) и инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ в течение 9 сут. Замену среды проводили через каждые 3 сут, рост сфероидов контролировали с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 с системой поддержки роста живых клеток InCell Analyzer Live Cell Package C (GE Healthcare).

Изучение пролиферативной активности клеток глиобластомы. Клетки (8×10^3 клеток на лунку) вносили в 96-луночный планшет в полной среде. Через 24 ч добавляли к клеткам темозоломид (Sigma-Aldrich, Германия) в диапазоне концентраций от 5 до 1500 мкМ в трехкратных повторах. Инкубацию проводили в течение 48 ч, затем добавляли в каждую лунку по 20 мкл раствора МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразолия бромид (Sigma-Aldrich, Германия)) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали еще 4 ч, затем среду отбирали и добавляли к ним по 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Оптическую плотность раствора формазана определяли на спектрофотометрическом анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при 570 нм, используя ДМСО как нулевой контроль. Для препарата строили график зависимости «доза–эффект» и определяли IC₅₀.

Определение количества клеток CD133+. Для проведения анализа клетки первичной линии GBM002 и U-87MG (2×10^5 клеток на лунку) высевали на 6-луночные планшеты в среде для роста стволового потенциала с добавлением EGF и FGF и культивировали 14 сут для формирования нейросфер. После инкубации клетки были дезинтегрированы до моноклеточной суспензии с помощью трипсина (Sigma-Aldrich, Германия) и подготовлены для проведения исследования экспрессии поверхностного маркера CD133. В качестве клеток сравнения брали клетки линии GBM002 и U-87MG, растущие в 2D-культуре. Клетки окрашивали на клеточный маркер CD133 с помощью антител, меченых VioBright FITC (Myltenyi, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Для исключения из анализа поврежденных клеток в образцы добавляли 2 мкг/мл йодида пропидия. К контрольным клеткам добавляли изотипический контроль, меченый AlexaFluor 488 (Invitrogen, США). Анализ проводили на проточном цитометре Novocyt 2000R (ACEA Biosciences), собирая 3×10^4 событий в анализируемый

гейт. Изучение экспрессии CD133 на поверхности клеток проводили путем установки маркера по отношению к изотипическому контролю, меченному AlexaFluor 488 (Invitrogen, США).

Изучение формирования сфероидов под действием темозоломида. Для анализа клетки первичной линии GBM002 и U-87MG (2×10^5 клеток на лунку) высевали на 6-луночные планшеты в среде для роста стволового потенциала с добавлением EGF и FGF и культивировали 9 сут для формирования нейросфер. После этого клетки были разделены на 2 группы: контрольную и с добавлением 50 мкМ темозоломида (замену среды проводили каждые 2 сут). В контрольные клетки добавляли аналогичную концентрацию ДМСО. После 7-дневной инкубации с темозоломидом клетки были окрашены с помощью Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия). Стекла заключали под покровное стекло с использованием полимерной флуоресцентной монтажной среды (Dako, Дания) и изучали образовавшиеся нейросферы с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 при увеличении 20 и программного обеспечения InCell Investigator (GE Healthcare).

Фиксация и иммунофлуоресцентное окрашивание сфероидов и клеток. Для проведения анализа экспрессии поверхностных маркеров на клетках глиобластомы фиксировали сфероиды *in situ* с использованием 10 % нейтрального забуференного формалина с последующей промывкой в PBS для удаления фиксатора. Для окрашивания сфероидов обрабатывали их метанолом с последующим добавлением 20 % ДМСО/метанола для улучшения проникновения антител, а затем инкубировали в 10 % BSA. Сфероиды окрашивали первичными антителами к рецепторам эндотелиального фактора роста 1-го и 2-го типов (VEGFR1, VEGFR2), фактора роста фибробластов 2-го типа (FGFR2) и фактору, индуцируемого гипоксией, 1α (HIF-1α) (Santa Cruz Biotechnology, США) при температуре 4 °C в течение 18 ч. Далее сфероиды промывали в PBS, последовательно обрабатывали конъюгатом антивидовых IgG с флуорофором AlexaFluor 488 (Life Technologies, США) и докрашивали ядра Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия). Стекла заключали под покровное стекло с помощью полимерной флуоресцентной монтажной среды (Dako, Дания). Аналогично окрашивали клетки глиобластомы, культивировавшейся в 2D-культуре. Стекла анализировали с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 при увеличении 20 и программного обеспечения InCell Investigator (GE Healthcare).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки роста клеток первичной глиобластомы провели исследование с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 с системой поддержки роста живых клеток InCell

Analyzer Live Cell Package C (GE Healthcare) в течение 9 сут после внесения клеток на поверхность планшета при температуре 37 °C (рис. 1).

Согласно полученным данным клетки первичной глиобластомы GBM002, выделенные из операционного материала, образуют нейросферы (см. рис. 1). После сборки 3D-модельной системы клетки глиобластомы GBM002 сохраняли способность к росту в 2D-культурах и образованию нейросфер. Клетки линии U-87MG при культивировании в 3D-модели также образовывали нейросферы. Это указывает на то, что культивирование в 3D-модели может влиять на популяцию стволовых клеток с образованием нейросфер. Исследование 3D-культуры с помощью автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 с системой поддержки роста живых клеток InCell Analyzer Live Cell Package C (GE Healthcare) позволяет проводить динамический контроль изменений нейросфер при сохранении условий культивирования. Определение количества стволовых опухолевых клеток CD133+ при культивировании в 2D- и 3D-культурах было выполнено с использованием проточной цитометрии (рис. 2).

При культивировании клеток U-87MG в 2D-клеточных культурах количество клеток CD133+ не превышает 2 %, как было показано ранее [5, 6]. После культивирования клеток глиобластомы в 3D-культурах количество клеток CD133+ увеличивается до 19,22 % для клеток GBM002 и до 16,38 % для клеток линии U-87MG (см. рис. 2).

Для определения влияния темозоломида на рост клеток глиобластомы GBM002 мы проводили культивирование нейросфер в присутствии данного препарата (Sigma, Германия) в субцитотоксических концентрациях, затем дезинтегрировали их, нанесли полученную суспензию клеток на 8-луночные культуральные стекла (BD Biosciences) и культивировали в течение 3 сут. Полученные нейросферы были окрашены с помощью Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия) и были исследованы с использованием автоматической системы для клеточного анализа InCell Analyzer 6000 (GE Healthcare), результаты представлены на рис. 3.

Согласно полученным данным клетки глиобластомы GBM002, которые длительно культивировали в присутствии нецитотоксических концентраций

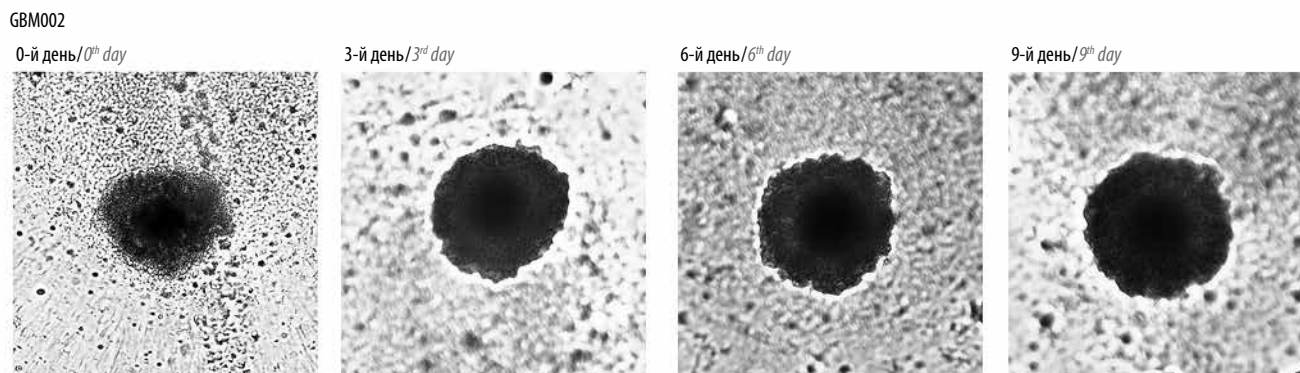


Рис. 1. Образование сфероидов из первичных клеток глиобластомы человека GBM002 на 0–9-е сутки культивирования

Fig. 1. The formation of spheroids from primary cells of human glioblastoma GBM002 on 0–9 days of cultivation

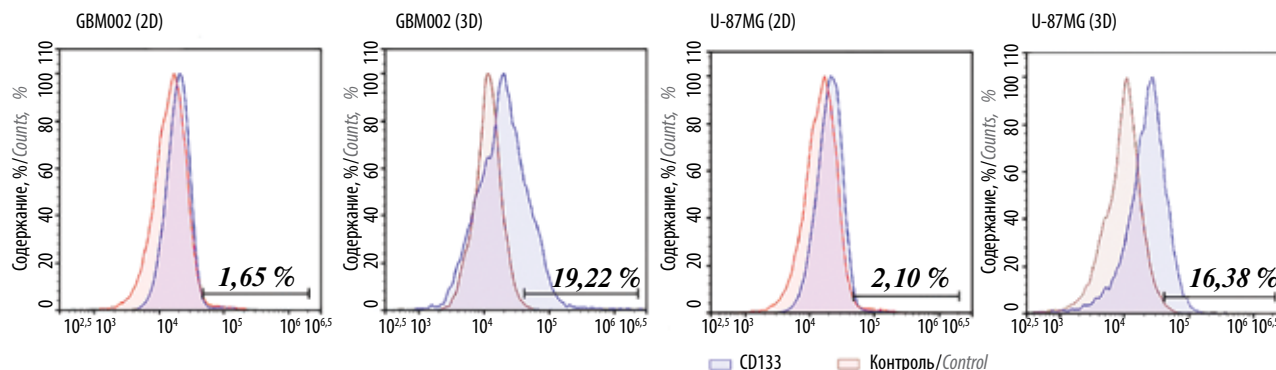


Рис. 2. Сравнение содержания клеток CD133+ при культивировании клеток GBM002 и U-87MG в нейросферах и двухмерных (2D) культурах на 14-й день культивирования. Маркер установлен по отношению к контрольному образцу с изотипическим контролем, меченным AlexaFluor 488

Fig. 2. Comparison of CD133+ cell content in GBM002 and U-87MG cells cultured in neurospheres and 2D-cultures on day 14 of cultivation. The marker is set in relation to the control sample with isotypic control labeled AlexaFluor 488

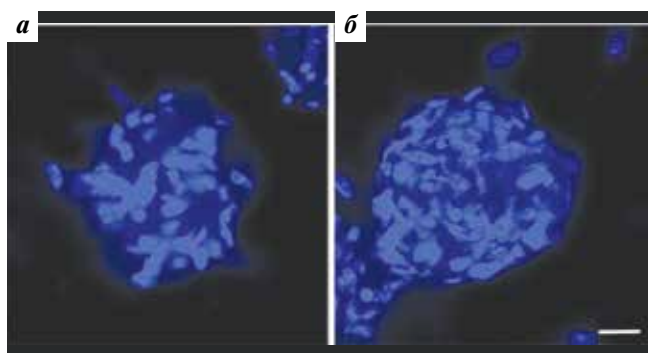


Рис. 3. Образование сфероидов из клеток глиобластомы GBM002 под действием темозоломида (а) и контрольные нейросферы (б). Масштаб 50 мкм

Fig. 3. The formation of spheroids from GBM002 glioblastoma cells under the influence of temozolomide (a) and control neurospheres (b). Scalebar 50 μ m

темозоломида, образуют нейросферы меньших плотности и размера по сравнению с нейросферами, образованными контрольными клетками глиобластомы GBM002.

Для оценки экспрессии поверхностных рецепторных тирозинкиназ VEGFR1, VEGFR2, FGFR2, а также HIF-1 α при росте клеток глиобластомы GBM002 в нейросферах мы проводили окрашивание образованных сфероидов с помощью антител к VEGFR1, VEGFR2, FGFR2, HIF-1 α и вторичных антител, конъюгированных с флуорофором AlexaFluor 488 (Life Technologies, США) и Hoechst 33258 (ПанЭко,

Россия) для окраски ядер. Серию микрофотографий экспрессии исследуемых биомаркеров получали с помощью InCell Analyzer 6000 (GE Healthcare) (рис. 4).

Было показано, что экспрессия рецепторных тирозинкиназ при культивировании клеток глиобластомы GBM002 в нейросферах отличается от таковой в 2D-культурах. Установлено, что в нейросферах в значительной степени увеличивается экспрессия FGFR2 и VEGFR1. В то же время экспрессия VEGFR2 снижалась по сравнению с клетками, культивировавшимися в плоских культурах. Экспрессия HIF-1 α увеличивалась на клетках внутри нейросферы, но отсутствовала на поверхности, что свидетельствует об увеличении уровня гипоксии внутри сфероида. Клетки глиобластомы GBM002 в культуре не экспрессируют данный маркер.

Таким образом, при культивировании клеток в нейросферах они изменяют экспрессию ряда рецепторных тирозинкиназ, увеличивают количество клеток CD133+ и повышают экспрессию HIF-1 α внутри сфероида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение системы 3D-культур клеток позволяет получать более гетерогенную популяцию опухолевых клеток, отражающую пространственную неоднородность клеток, повышать пул стволовых клеток и воссоздавать условия гипоксии внутри микроопухолей головного мозга.

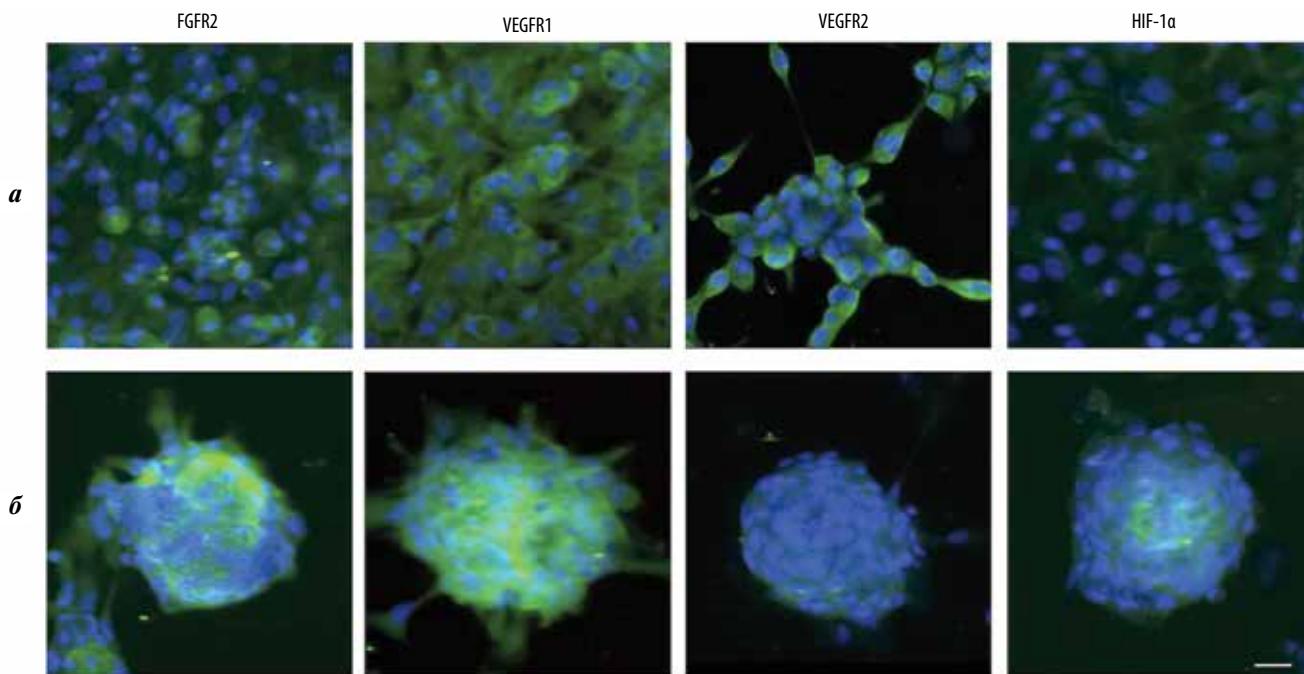


Рис. 4. Экспрессия рецепторных тирозинкиназ и фактора, индуцируемого гипоксией, 1 α (HIF-1 α) на клетках, культивировавшихся в двухмерных культурах (а) и нейросферах (б) глиобластомы GBM002. Масштаб 50 мкм

Fig. 4. Expression of receptor tyrosine kinases and hypoxia inducible factor, 1 α (HIF-1 α) on cells cultured in two-dimensional cultures (a) and neurospheres (b) of GBM002 glioblastoma. Scalebar 50 μ m

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Zong H., Verhaak R.G.W., Canoll P. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;4(12):383–94. DOI: 10.1586/erm.12.30.
2. Venur V.A., Peereboom D.M., Ahluwalia M.S. Current medical treatment of glioblastoma. *Cancer Treat Res* 2015;(163):103–15. DOI: 10.1007/978-3-319-12048-5_7.
3. Morokoff A., Ng W., Gogos A., Kaye A.H. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clin Neurosci* 2015;8(22):1219–26. DOI: 10.1016/j.jocn.2015.02.008.
4. Bez A., Corsini E., Curti D. et al. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 2003;1–2(993):18–29. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.08.061.
5. Kahlert U.D., Koch K., Suwala A.K. et al. The effect of neurosphere culture conditions on the cellular metabolism of glioma cells. *Folia Neuropathol* 2015;3(53):219–25. DOI: 10.5114/fn.2015.54422.
6. Platet N., Liu S.Y., Atifi M.E. et al. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett* 2007;258(2):286–90. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.09.012.

Вклад авторов

Ю.А. Хоченкова, Ю.С. Мачкова: получение и поддержание первичных опухолевых культур, формирование нейросфер, написание текста рукописи;

И.Г. Дырда: получение операционного материала для исследований, верификация диагноза;

Э.Ш. Соломко, Т.С. Сидорова: изучение экспрессии маркеров методом проточной цитометрии, иммунофлуоресцентная окраска клеток;

Д.А. Хоченков, Е.А. Авилова: конфокальная микроскопия, разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

Yu.A. Khochenkova, Yu.S. Machkova: receiving and maintaining primary tumor cultures, forming neurospheres, writing manuscript text;

I.G. Dyrda: obtaining operational material for research, verification of the diagnosis;

E.Sh. Solomko, T.S. Sidorova: study of marker expression by flow cytometry, immunofluorescence staining of cells;

D.A. Khochenkov, E.A. Avilova: confocal microscopy, development of research design.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ю.А. Хоченкова/Yu.A. Khochenkova: <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>

Ю.С. Мачкова/Yu.S. Machkova: <https://orcid.org/0000-0002-1138-8827>

Э.Ш. Соломко/E.Sh. Solomko: <https://orcid.org/0000-0002-8070-4707>

Д.А. Хоченков/D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке компании GE Healthcare Life Sciences.

Financing. The study was performed with the support of GE Healthcare Life Sciences.

