

Оптическая визуализация комбинированных флуоресцентных клеточных сфероидов и исследование их роста при воздействии химиопрепарата

© А.С. Согомонян^{1,2}, П.А. Котельникова¹, Д.Э. Демин³, А.Б. Миркасымов^{1,4}, С.М. Деев^{1,4,5}, А.В. Звягин^{1,4,6}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

² Инженерно-физический институт биомедицины (ИФИБ), Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ (Московский инженерно-физический институт), 115409 Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

⁴ Институт молекулярной тераностики, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

⁵ Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, 420008 Казань, Россия

⁶ MQ Photonics Centre, Macquarie University, 2109 Sydney, Australia

e-mail: mirkasymov@phystech.edu

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

В окончательной редакции 19.01.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Разработка новых препаратов для лечения рака требует более глубокого понимания механизмов канцерогенеза и их более точного воспроизведения. Создание трехмерных клеточных моделей стало важным шагом в исследовании опухолевой стромы и воссоздании релевантной модели рака. С применением 3D-печати и микромолдинга мы получили полимерные молды для быстрого формирования клеточных сфероидов, их длительной инкубации и микроскопии. Формы были использованы для создания сфероидов раковых и стромальных клеток и их комбинаций. Для того чтобы различать опухолевые и стромальные клетки при сокультивации, они были трансдуцированы генами флуоресцентных белков в разных областях видимого спектра. Флуоресцентная микроскопия позволила не только наблюдать за динамикой роста сфероидов, но и оценивать отдельно чувствительность раковых и стромальных клеток к терапии цитостатиком. Разработанная форма упрощает воссоздание релевантной трехмерной модели рака и тестирование цитотоксических препаратов, а полученные результаты демонстрируют важность оптических методов в исследовании противоопухолевой эффективности лекарств.

Ключевые слова: 3D-печать, мультিকлеточные опухолевые сфериды, флуоресцентная микроскопия, цисплатин, химиотерапия.

DOI: 10.61011/OS.2024.03.58145.29-24

Введение

Успешная борьба с раком включает в себя как изучение фундаментальных механизмов канцерогенеза, так и разработку и тестирование препаратов, ингибирующих рост и развитие опухоли [1]. Иммутизированные, в том числе раковые, клеточные линии человека и млекопитающих давно используются в биологии для изучения процессов жизнедеятельности клеток, описания их свойств и поведения, а главное механизмов, лежащих в их основе. Раковые клетки исследуются в двумерных системах, ставших классическими *in vitro* моделями поведения адгезионных клеточных культур [2].

Разрабатываемые лекарственные препараты, проходящие доклинические испытания, должны сначала тести-

роваться *in vitro* на клеточных моделях. Кандидаты, прошедшие такой первичный экспериментальный отбор, далее могут тестироваться *in vivo* [3]. Такой подход позволяет сэкономить время и ресурсы, сразу отбрасывая неэффективные препараты, а также является более этичным по отношению к экспериментальным животным. При этом сложность животных моделей часто приводит к неоднозначным результатам и проблеме в их интерпретации [4]. В отличие от организменного уровня трехмерные клеточные системы являются значительно более простыми с точки зрения устройства и организации различных биологических процессов, но при этом лучше моделируют изучаемые процессы, чем двумерные, благодаря формированию более сложной архитектуры и возникающим диффузионным ограничениям [5].

Клеточные сфероиды позволяют моделировать трехмерную структуру опухоли вместе с межклеточными контактами [6]. Вместо крепления к твердому пластику клетки начинают связываться друг с другом и формировать внеклеточный матрикс, что может значительно влиять на их поведение [7,8]. Кроме того, сфероиды характеризуются большей гетерогенностью, чем двумерные модели, наличием градиентов нутриентов, кислорода и других молекул, в результате чего в плотном ядре сфероида воссоздается область гипоксии, свойственная многим опухолям [5,8,9]. Клеточные сфероиды демонстрируют большую устойчивость к химиотерапии, чем двумерные культуры [10]. Таким образом, тестирование на таких моделях позволяет определить возможность лекарственных препаратов проникать вглубь опухоли, а также точнее оценить необходимые для терапии концентрации.

Однако трехмерные системы из монокультур раковых клеток все еще не могут воспроизвести строение опухоли, формирующейся в сочетании с эндотелиальными клетками, фибробластами и иммунными клетками [11]. Известно, что сокультивирование с клетками стромы значительно влияет на инвазию и пролиферацию [12,13], экспрессию генов [14] и поведение клеток [15].

Для наблюдения за разными типами клеток в трехмерных структурах необходимо использовать отличающиеся друг от друга метки. Флуоресцентные метки широко используются в биологических исследованиях как простой инструмент, позволяющий проводить неинвазивные наблюдения [16]. Благодаря поглощению и излучению в разных спектрах оптического диапазона различные флуоресцентные метки могут быть применены одновременно для визуализации и различения изучаемых объектов [17]. Флуоресцентная микроскопия хорошо применима для наблюдения сфероидов из клеток, экспрессирующих флуоресцентные белки, так как интенсивность их флуоресценции позволяет оценить жизнеспособность клеток и может быть использована при тестировании противоопухолевых препаратов *in vitro* [18].

Здесь мы спроектировали 3D-модель молда для фотополимерной печати, заливаемого агарозой для создания прозрачной в видимом диапазоне формы, в которой клеточные сфероиды могут массово, быстро и с малыми трудозатратами культивироваться, тестироваться и наблюдаться посредством флуоресцентной микроскопии. Разработанные молды были протестированы для создания сфероидов из монокультур эндотелиальных клеток человека EA.hy926, рака яичников человека SKOVip-kat, рака молочной железы мыши EMT6/p, фибробластов мыши L929, а также их комбинаций. Флуоресценция красного флуоресцентного белка TurboFP635 (Katushka), экспрессируемого в опухолевых клетках, позволила в динамике оценивать рост и жизнеспособность сфероида. Было изучено влияние цисплатина на опухолевые и комбинированные сфероиды, а благодаря флуоресценции клеток на разных длинах волн мы наблюдали воздействие модельного цитотоксического

агента в отдельности на раковые клетки и фибробласты внутри комбинированного сфероида и обнаружили, что воздействию химиопрепарата в первую очередь подвержены фибробласты во внешней части сфероида, тогда как опухолевые клетки в центре сфероида проявляли значительную резистентность.

Материалы и методы

Клеточные линии

Клеточные линии SKOVip-kat (карцинома яичника человека со стабильной экспрессией красного флуоресцентного белка TurboFP635 (Katushka)), EMT6/p (рак молочной железы мыши), EA.hy926 (иммortalизованные эндотелиальные клетки пупочной вены человека), L929 (фибробласты мыши) были получены из коллекции Лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН. Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% FBS (бычьей фетальной сыворотки) (HyClone, США), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия), 50 units/ml/50 mcg/ml пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия). Сфероиды культивировали в бесцветной среде DMEM без фенолового красного (Gibco, Великобритания), содержащей 10% бычьей фетальной сыворотки (HyClone, США), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 50 units/ml/50 mcg/ml пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия). Клетки и сфероиды инкубировали при 37°C и 5% CO₂.

Получение флуоресцентных линий клеток

Для получения флуоресцентных линий клеток проводили трансдукцию с помощью лентивирусных частиц LVT-TurboFP635 (Евроген, Россия) для EMT6/p и LVT-TagGFP2 (Евроген, Россия) для EA.hy926 и L929. Для этого 10⁴ клеток высевали на 6-луночные планшеты и добавляли 100 µl лентивирусных частиц с титром 0.5 · 10⁶ Т.Е./ml. Клетки с частицами инкубировали при 37°C и 5% CO₂ и через 24 h заменяли среду. Эффективность трансдукции проверяли методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Трансдуцированные клетки пересевали на культуральные матрасы и культивировали до достижения экспоненциальной фазы роста. Сортировку флуоресцентных клеток проводили с помощью сортера S3e Cell Sorter (Bio-Rad Laboratories, США). После сортировки клетки наращивали, криоконсервировали и хранили при -150°C до эксперимента.

Разработка полимерных форм

81-луночные формы для заливки агарозы моделировали в программе Autodesk Fusion 360. Печать форм проводили на 3D-принтере FormLabs Form3 (США) с

помощью фотополимера Formlabs Clear Resin. Распечатанные формы очищали от остатков неполимеризованной смолы этанолом в ультразвуковой ванне, сушили и продували. Затем формы подвергались излучению УФ диодной лампы мощностью 120 W в течение 20 min для завершения процесса полимеризации.

Получение сфероидов

В полимерные молды заливали 900 μ l горячей 1% агарозы (ПанЭко, Россия) в бесцветной среде DMEM (Gibco, Великобритания) без сыворотки. Затвердевшие агарозные формы помещали в 12-луночные планшеты (Corning, США) и вносили в них разное количество клеток (из расчета 2000 или 3000 клеток на лунку агарозной формы) в 190 μ l бесцветной среды DMEM. Планшеты оставляли неподвижными до оседания клеток на дно агарозной формы. Затем в лунки добавляли 1 ml бесцветной среды DMEM с 10% FBS, а планшеты аккуратно переносили в инкубатор с влажной средой, 37°C и 5% CO₂ для формирования и роста сфероидов.

Оценка цитотоксичности

Резазурин-тест. Токсичность противоопухолевого препарата цисплатина оценивали с помощью резазурин-теста. Сфероиды растили 3 дня в агарозных формах при 37°C и 5% CO₂ и после добавляли цитотоксичный агент в различных концентрациях. На 7-й день удаляли среду и добавляли 1 ml раствора резазурина (13 mg/l) в культуральной среде. Инкубировали 24 h при 37°C и 5% CO₂. Далее перемешивали среду в лунках пипетированием и отбирали по 100 μ l среды в 96-луночный планшет (в трех повторях). В качестве базовой линии использовали флуоресценцию раствора резазурина, который инкубировали в лунках планшета с агарозными формами при тех же условиях, но без клеток. Измерение проводили на спектрофотометре Infinite M100 Pro (Tecan, Австрия) при длине волны возбуждения/эмиссии 570/595 nm. Концентрацию цисплатина, вызывающую 50% ингибирование роста (IC₅₀) клеток, определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.5.1.

Флуоресценция сфероидов. Оценку токсичности противоопухолевого препарата проводили с помощью детекции флуоресценции белков Katushka (TurboFP635, далее RFP) и GFP. Сфероиды растили 3 дня в агарозных формах при 37°C и 5% CO₂, после добавляли цисплатин в различных концентрациях и на 7-й день оценивали флуоресценцию живых клеток в сфероидах, используя фильтры возбуждения и эмиссии 545/30 и 610/75 nm для красного канала, 470/40 и 525/50 nm для зеленого канала. Флуоресценцию детектировали на флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Германия). Интенсивность флуоресценции сфероидов за вычетом фоновой флуоресценции оценивали с помощью

программного обеспечения ImageJ 1.51j8, согласно формуле:

STCF = Интегральная плотность — (Площадь

выбранного сфероида \times Средняя флуоресценция фона).

Рост сфероидов. Динамику роста сфероидов оценивали от 1 до 8 дней после внесения клеток в агарозные формы. Для этого изображения сфероидов в проходящем свете получали на микроскопе Leica DMI6000B при помощи программного обеспечения LAS AF 2.7.712402. Измерение диаметра сфероидов проводили с помощью программного обеспечения ImageJ 1.51j8.

Статистический анализ

Все эксперименты повторяли как минимум шесть раз. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Статистическую значимость между двумя группами определяли с использованием *t*-критерия Уэлча для неравных дисперсий. Значения $P < 0.05$ и < 0.01 обозначались * и ** соответственно.

Результаты и дискуссия

Для быстрого и нетрудозатратного культивирования сфероидов нами была разработана 3D-модель (рис. 1, a + файл stl) для печати из фотополимера на 3D-принтере (рис. 1, b), представляющая из себя емкость с плоским дном и наклонной одной из сторон. В емкости установлен постамент с множеством выпуклостей, которые после заливки молда расплавленной агарозой создают в затвердевшей агарозе низкоадгезивные лунки для формирования сфероидов (рис. 1, c). Размер получаемой агарозной формы оптимизирован под размер лунки 12-луночного культурального планшета и содержит квадрат из 9 \times 9 лунок для сфероидов. Плоское дно 3D-модели служит для удобства печати прямо на платформе 3D-принтера. Наклонная стенка позволяет поддевать и откреплять напечатанное изделие с платформы принтера, а также поддевать и вытаскивать застывшую агарозную форму из данного молда. Размер лунок оптимизирован по высоте, чтобы сфероиды не перемещались из лунок в процессе передвижения агарозной формы. Дно лунок представляет собой полусферу, чтобы оседающие клетки формировали единый сферический конгломерат на дне лунки. Размер лунок составляет 800 μ m в диаметре и позволяет формировать сфероиды в широком диапазоне размеров (начиная от \sim 200 μ m).

Постамент в молде формирует углубление в агарозной форме, в которую заливается жидкость с клетками. Благодаря специальной форме поверхности постамента (доп. рис. 1) клетки оседают именно на дно лунок. В результате одним движением пипетки получается сформировать 81 сфероид с примерно одинаковым количеством клеток. Получаемая агарозная форма является

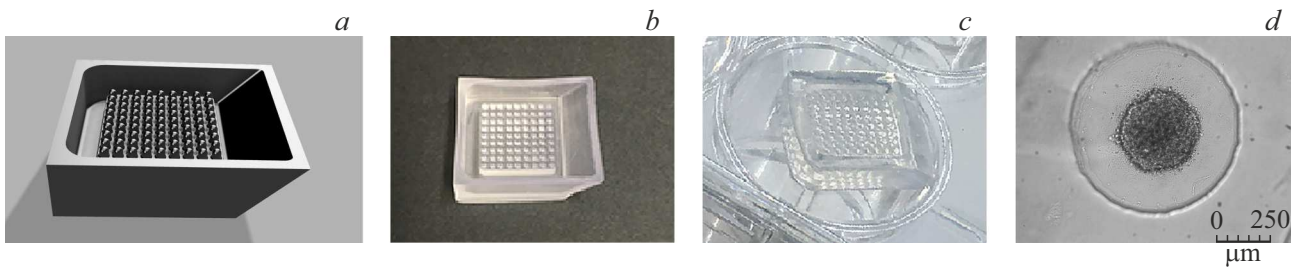


Рис. 1. Формирование сфероидов с использованием разработанного мода: *a* — 3D-модель мода; *b* — мод, распечатанный с помощью 3D-принтера; *c* — затвердевшая агарозная форма, помещенная в 12-луночный планшет; *d* — сфероид, сформированный в лунке агарозной формы.

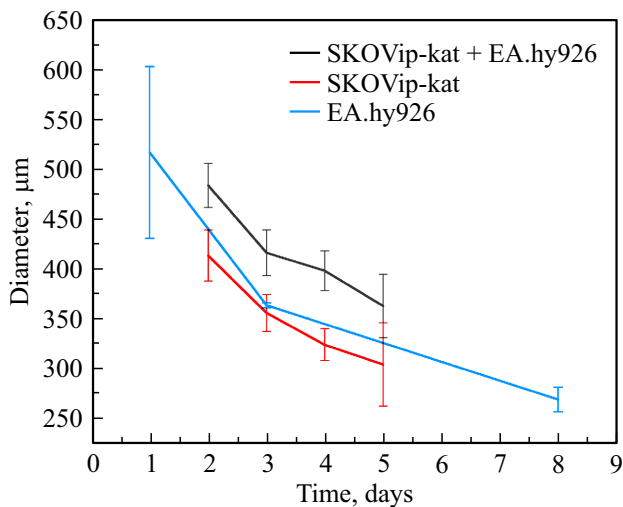


Рис. 2. Динамика размеров формирующихся сфероидов. 3000 клеток на лунку суммарно.

достаточно тонкой и прозрачной в оптическом диапазоне, что позволяет наблюдать формирование сфероидов в микроскопе прямо в агарозной форме в 12-луночном планшете (рис. 1, *d*).

С использованием разработанного мода были сформированы сфероиды из различных клеточных линий и их комбинаций. На первом этапе работы мы изучили формирование мультиклеточных сфероидов из клеток эндотелия человека EA.hy926, аденокарциномы яичников человека SKOVip-kat, а также их смеси (рис. 2). Выбор клеток SKOVip-kat связан с успешным опытом их применения для создания трехмерных клеточных моделей и скрининга лекарственных препаратов в предыдущих работах лаборатории [18]. Культивируя клетки SKOVip-kat и EA.hy926 в агарозных формах, мы наблюдали уменьшение размеров и уплотнение сфероидов в связи с формированием межклеточных контактов и реорганизацией внеклеточного матрикса [19]. В результате сфероиды из эндотелиальных клеток сжались с 516 ± 86 nm в первый день до 268 ± 12 nm на восьмой день, сфероиды из клеток рака яичников сжались с 413 ± 26 nm на второй день до 303 ± 42 nm на пятый день, а сфероиды

из смеси клеток сжались с 483 ± 22 до 362 ± 32 nm на второй и пятый день соответственно. Полученные сфероиды из клеток рака яичников имели достаточно ровную сферическую форму (доп. рис. 2) и относились к типу плотных сфероидов [20]. При этом клетки эндотелия изначально формировали более рыхлую структуру по сравнению с клетками рака яичников, но постепенно стягивались и сжимали сфероид. Аналогичное поведение было замечено исследователями при сокультивировании клеток метастазирующего рака молочной железы MDA-MB-231 и нетуморогенных эпителиальных клеток MCF-10A [21].

Благодаря экспрессии флуоресцентного белка Katushka (TurboFP-635, далее RFP) с пиком поглощения/испускания на длине волны 588/635 nm сфероиды из клеток аденокарциномы яичников можно характеризовать не только по размеру (рис. 2), но и по интенсивности флуоресценции, коррелирующей с жизнеспособностью клеток. Ранее мы показали, что измерение интенсивности флуоресценции сфероидов может быть эффективным методом оценки жизнеспособности клеток наряду с традиционными колориметрическими тестами и проточной цитометрией [22]. Оказалось, что интенсивность флуоресценции сфероидов из клеток SKOVip-kat, а также из их смеси с нефлуоресцентными эндотелиальными клетками незначительно менялась в процессе формирования сфероидов от 2 до 5 дней (доп. рис. 3). Причем флуоресценция сфероидов внутри одной группы различалась значительно больше, чем физический размер, что привело к большим стандартным отклонениям. Можно сделать вывод, что в процессе формирования сфероидов из клеток SKOVip-kat, образования межклеточных контактов и его уплотнения количество клеток менялось незначительно. Отсутствие пролиферации также наблюдается, например, при формировании сфероидов из клеток (рака молочной железы) РМЖ MCF-7, фибробластов hFIB и их комбинации [23]. Кроме того, разница в динамике изменения физического размера сфероидов и интенсивности его флуоресценции подчеркивает неправильность использования физического размера сфероидов как показателя его жизнеспособности.

Для наблюдения за клетками опухоли и стромы в составе многоклеточного сфероидов нами была разра-

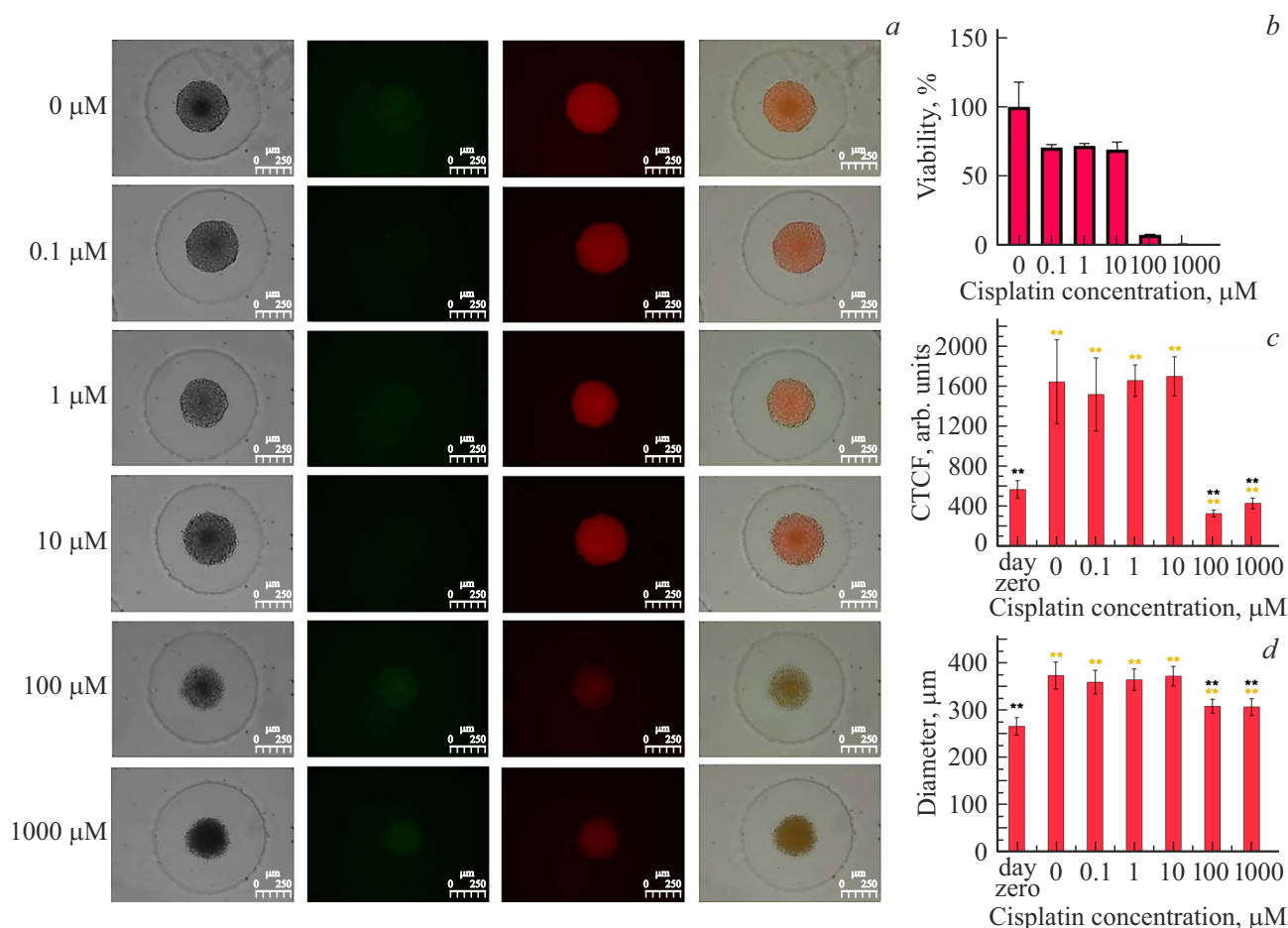


Рис. 3. Воздействие цисплатина на сфероиды EMT6/p-RFP (рак молочной железы мыши). 2000 клеток на лунку, 7-й день. *a* — микроизображения сфероидов в проходящем свете, зеленая и красная флуоресценция, наложение, *b* — резазурин-тест, *c* — флуоресценция сфероидов в красном канале, *d* — диаметр сфероидов. Шкала 250 μm . ** — $P < 0.01$, *t* — критерий Уэлча. Желтая * — сравнение со столбиком day zero, черная * — сравнение со столбиком при нулевой концентрации.

ботана флуоресцентная модель рака молочной железы мыши. Мы трансдуцировали клетки РМЖ мыши EMT6/p и клетки мышинных фибробластов L929 красным (RFP) и зеленым (GFP) флуоресцентными белками соответственно. Флуоресценция на разных длинах волн позволила различать клетки в их смеси (доп. рис. 4). При этом видно, что клетки РМЖ вместе с фибробластами формировали достаточно плотное ядро сфероида, тогда как во внешнем слое оказывались только фибробласты.

Полученные сфероиды были использованы для тестирования химиопрепаратов. Цисплатин — широко используемый препарат для лечения различных видов рака, основной механизм которого основан на связывании с гетероциклическими основаниями ДНК и нарушении процесса репликации [24]. Мы изучили воздействие цисплатина в разных концентрациях на сфероиды из клеток РМЖ мыши и отслеживали изменения физического размера сфероидов, интенсивности их флуоресценции, а также оценивали их жизнеспособность посредством резазурин-теста (рис. 3).

Сфероиды из клеток РМЖ мыши EMT6/p-RFP, в отличие от сфероидов из SKOVip-kat и EA.hy926, изначально формировали очень плотный конгломерат и далее не сжимались, а, наоборот, увеличивались в размерах, что видно из сравнения столбиков диаграммы нулевого дня и контроля (рис. 3, d). При этом действие цисплатина в дозах до 10 μM не влияло на размер сфероида, тогда как 100 и 1000 μM имели практически одинаковое действие, ингибируя его рост и уменьшая диаметр с 371 \pm 28 nm до почти 300 nm по сравнению с 264 \pm 18 nm в нулевой день. Флуоресцентная микроскопия показала аналогичный результат при дозах до 10 μM , однако при больших концентрациях интенсивность флуоресценции падала соответственно до 330 \pm 33 arb.units (a.u.) и 433 \pm 53 a.u., что значительно меньше, чем флуоресценция сфероида в контроле (1642 \pm 418 a.u.) и даже в момент нулевого дня (570 \pm 88 a.u., рис. 3, c). Таким образом, цисплатин оказывал значительное действие в этих дозах, однако флуоресценция не падала до нуля, что может быть связано с резистентностью клеток в ядре сфероида либо с остаточной флуоресценцией белка после смерти

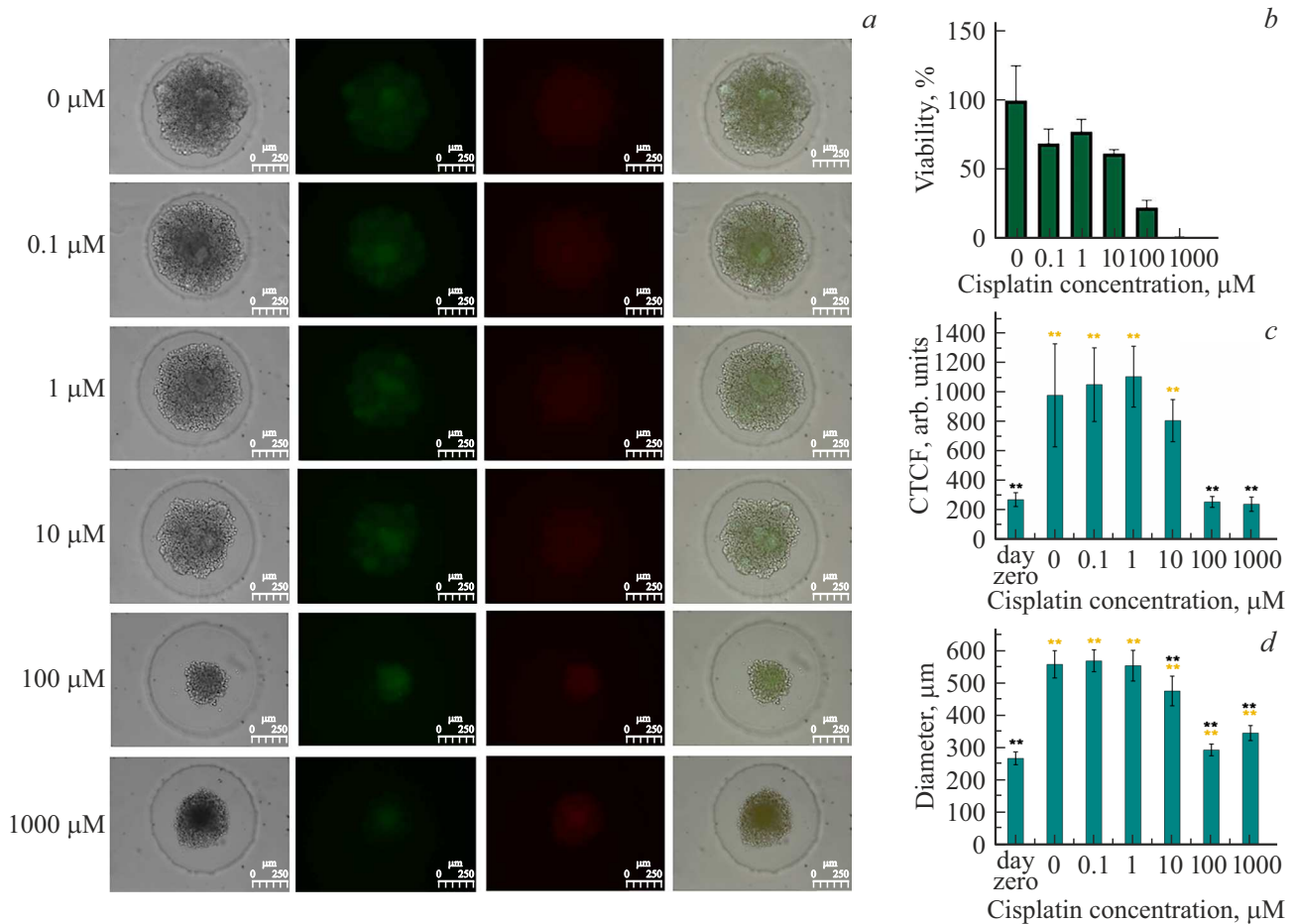


Рис. 4. Воздействие цисплатина на сфероиды L929-GFP (фибробласты мыши). 2000 клеток на лунку, 7-й день. *a* — микроизображения сфероидов в проходящем свете, зеленая и красная флуоресценция, наложение, *b* — резазурин-тест, *c* — флуоресценция сфероидов в зеленом канале, *d* — диаметр сфероидов. Шкала 250 μm. ** — $P < 0.01$, *t* — критерий Уэлча. Желтая * — сравнение со столбиком day zero, черная * — сравнение со столбиком при нулевой концентрации.

клеток. В свою очередь резазурин-тест, основанный на восстановлении резазурина в флуоресцентный резаруфин благодаря внутриклеточным ферментам и определяющий метаболическую активность клеток, показывал значительное действие даже при малых дозах препарата и полное подавление метаболизма при максимальной концентрации (рис. 3, *b*). Для сравнения в двумерной модели практически полное подавление жизнеспособности клеток ЕМТ6/р наблюдается при концентрации ~ 3 μM цисплатина [25].

Отличие результатов резазурин-теста от флуоресцентной микроскопии, вероятно, связано с механизмом действия цисплатина, который в первую очередь ингибирует метаболическую активность и только потом приводит к гибели клетки [24]. Кроме того, действие цисплатина частично обусловлено генерацией активных форм кислорода и соответственно зависит от концентрации кислорода [24]. А диффузия кислорода, так же как и молекул резазурина и резаруфина, ограничена внутри сфероидов, что локализует цитотоксическое действие цисплатина, а также чувствительность резазурин-теста во внешней

области сфероидов, в то время как флуоресцентный анализ не подвержен таким ограничениям.

При тестировании цисплатина на сфероидов из фибробластов мыши L929-GFP не наблюдалось значительного замедления роста сфероидов в размерах при концентрациях до 10 μM (рис. 4). Увеличение дозы препарата привело к уменьшению жизнеспособности клеток, падению интенсивности флуоресценции до уровня нулевого дня и почти полной остановке физического роста с результирующим размером, близким к уровню нулевого дня. Однако повышение концентрации до 1000 μM привело к разрыхлению сфероидов и значительному увеличению его диаметра по сравнению с нулевым днем, несмотря на полное подавление метаболизма. Такое поведение, отличное от сфероидов из клеток РМЖ, вероятно, связано с незавершенностью формирования сфероидов к моменту добавления цитостатика, вызванной более медленным ростом фибробластов, в то время как у сфероидов из раковых клеток пролиферация уже сменяется реорганизацией внеклеточного матрикса. Кроме того, на отсутствие жестких диффузионных ограничений в

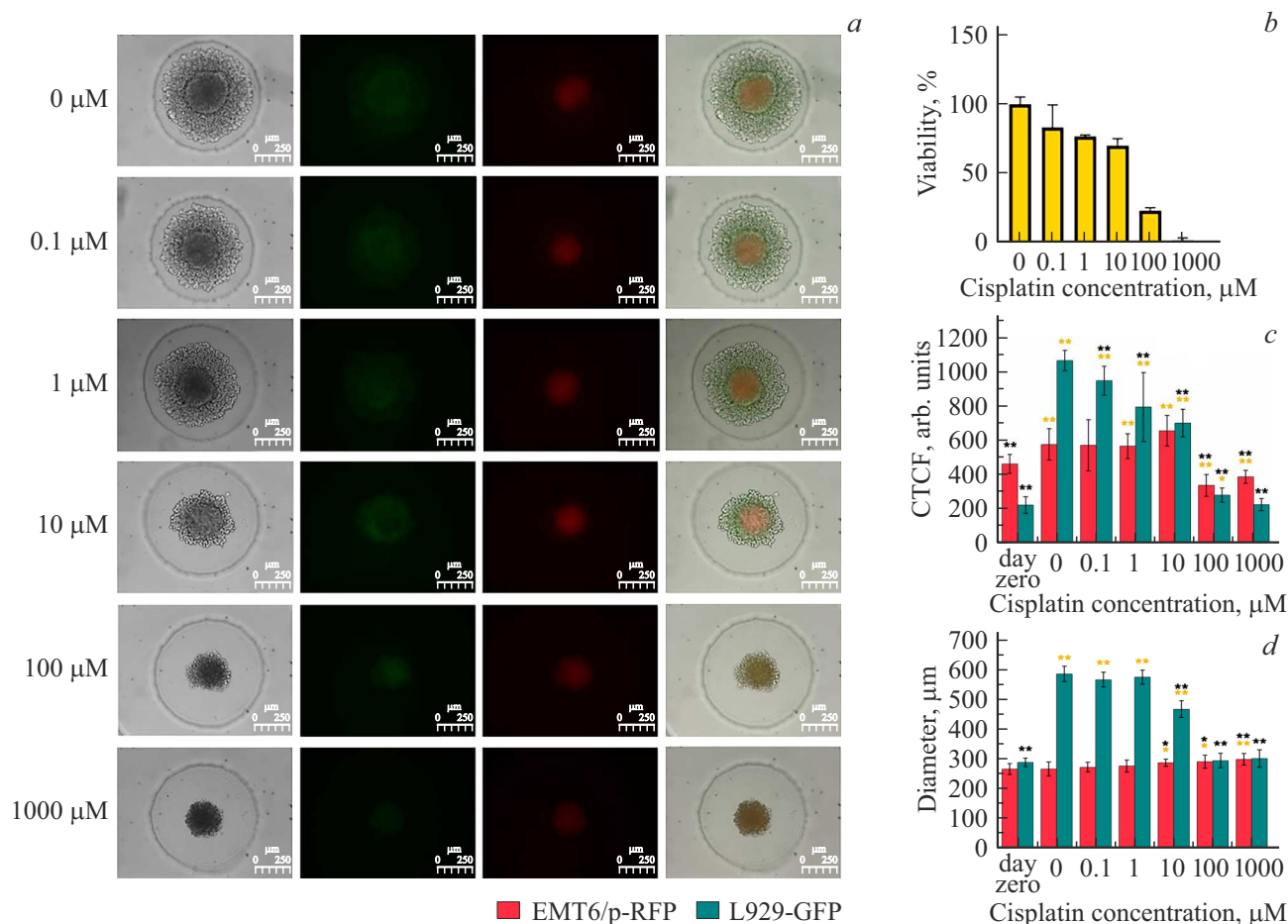


Рис. 5. Воздействие цисплатина на смешанные сфероиды EMT6/p-RFP+L929-GFP. 1000 + 1000 клеток на лунку, 7-й день. *a* — микроизображения сфероидов в проходящем свете, зеленая и красная флуоресценция, наложение; *b* — резазурин-тест; *c* — флуоресценция сфероидов в зеленом и красном каналах; *d* — диаметр красной и зеленой областей сфероида. Шкала 250 μm. ** — $P < 0.01$, * — $P < 0.05$, *t*-критерий Уэлча. Желтая * — сравнение со столбиком соответствующего канала day zero, черная * — сравнение со столбиком соответствующего канала при нулевой концентрации.

сфероидов из фибробластов указывает тот факт, что данные цитотоксичности оказались близки к результатам, полученным исследователями в двумерной модели [26].

Затем мы изучили действие цисплатина на смешанных сфероидов из опухолевых и стромальных клеток (рис. 5). Сравнение размеров красных и зеленых областей в контроле с нулевым днем позволило сделать вывод, что красное ядро сфероида из клеток РМЖ не росло в размерах, хотя флуоресценция увеличивалась, подтверждая пролиферацию клеток. При этом зеленые фибробласты сильно разрастались, достигая $586 \pm 26 \mu\text{m}$ в диаметре по сравнению с начальными $286 \pm 14 \mu\text{m}$ в момент нулевого дня и увеличивая флуоресценцию с 221 ± 48 до 1061 ± 58 а.е. Воздействие цисплатина в концентрации $10 \mu\text{M}$ привело к ингибированию роста и уменьшению размера зеленой области до $467 \pm 28 \mu\text{m}$, а увеличение дозы — к уменьшению до размеров нулевого дня. При этом диаметр красной области, состоящей из раковых клеток, незначительно менялся в зависимости от концентрации препарата. Флуоресцентный анализ показал по-

степенное уменьшение интенсивности зеленой флуоресценции с увеличением концентрации цисплатина вплоть до значений флуоресценции, соответствующих нулевому дню, при максимальной дозе. При этом воздействие на клетки РМЖ оказалось значительным только при дозе $100 \mu\text{M}$, при которой интенсивность флуоресценции уменьшилась сразу до 335 ± 63 а.е. по сравнению с 573 ± 91 а.е. в контроле и 460 ± 55 а.е. в нулевой день. Однако увеличение дозы в 10 раз не привело к уменьшению интенсивности флуоресценции, что, возможно, демонстрирует влияние остаточной флуоресценции на анализ и резистентность клеток в центре сфероида. При этом резазурин-тест, показывающий общую жизнеспособность смеси клеток, продемонстрировал постепенное снижение жизнеспособности с увеличением дозы вплоть до полного подавления метаболизма при максимальной концентрации. Несмотря на большую чувствительность, резазурин, как и другие колориметрические тесты, не дает возможности оценивать влияние препарата на отдельные клетки в смешанном сфероиде, а также оценивать

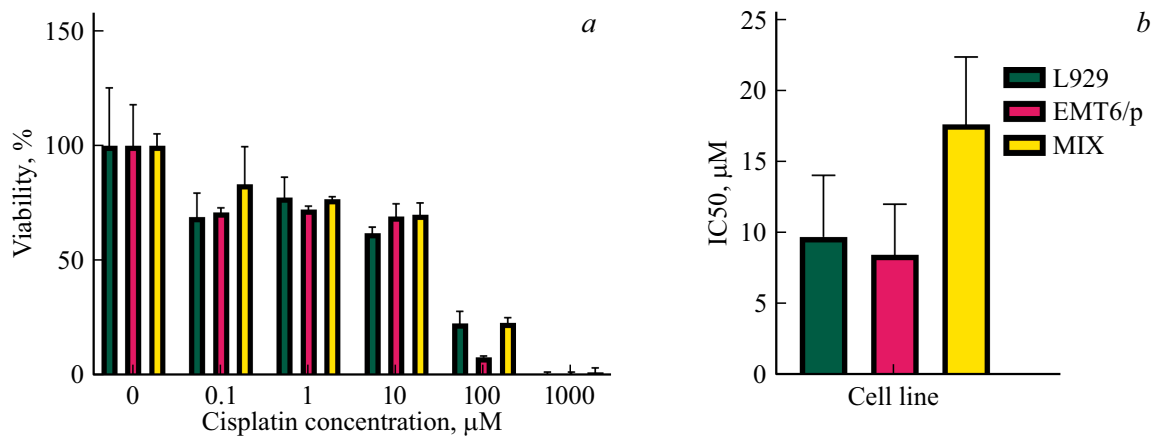


Рис. 6. Сравнение токсичности цисплатина по отношению к сфероидам L929-GFP, EMT6/p-RFP и их комбинации методом резазурин-теста. Жизнеспособность клеток после воздействия цисплатина (a), IC50 цисплатина для различных сфероидов (b).

жизнеспособность клеток в динамике. Флуоресценция же продемонстрировала, что действию цисплатина в первую очередь были подвержены фибробласты, тогда как на клетки РМЖ в ядре сфероида препарат не имел эффекта вплоть до 10 μM.

Сравнение действия цисплатина на сфероиды из разных клеточных линий показало, что сфероиды из смеси клеток были менее чувствительны к химиопрепарату, чем сфероиды из монокультур (рис. 6). При этом для сфероидов из фибробластов, клеток РМЖ и их смеси IC50 составила 9 ± 5, 8 ± 4, 17 ± 5 μM соответственно. Небольшие различия в чувствительности к противоопухолевой терапии, вероятно, связаны с модуляцией поведения клеток в различных трехмерных моделях [27].

Таким образом, оценка жизнеспособности сфероида по его физическому размеру посредством микроскопии проходящего света оказалась неэффективной и ограничено применимой только в случае со сфероидами из фибробластов, сильно разрастающихся в контроле и соответственно сильно меняющих свои размеры под воздействием цитостатиков. Флуоресцентная микроскопия позволяет оценивать жизнеспособность клеток с экспрессией флуоресцентных белков в динамике, однако остаточная флуоресценция препятствует точному анализу при почти полной гибели клеток. Резазурин-тест способен различить воздействие даже малых концентраций цитостатиков благодаря изменению метаболической активности клеток, проявляющейся раньше, чем гибель. Более того, отсутствие в мертвых клетках фоновой активности ферментов, восстанавливающих резазурин, позволяет применять метод для изучения воздействия на клетки химиопрепаратов в больших концентрациях. Однако диффузионные ограничения могут повлиять на результаты резазурин-теста вследствие слабого проникновения молекул вглубь стареющего и некротического ядра сфероида и обратно. Флуоресцентная микроскопия не подвержена такому ограничению, а также позволяет разделять и по отдельности изучать воздействие на

разные виды клеток в их смеси при условии, что клетки помечены маркерами разного цвета. Таким образом, каждый из методов обладает своими преимуществами и недостатками, а их совместное использование позволяет увидеть более полную картину изучаемого явления.

Заключение

С использованием технологии 3D-печати нами была разработана модель, позволяющая массово формировать и культивировать клеточные сфероиды, наблюдать за морфологией, поведением и распределением клеток в сфероиде и оценивать жизнеспособность клеток непосредственно в лунках полимерной формы.

Полученная модель была протестирована для создания сфероидов из разных типов клеток: в том числе раковых (рак яичников, РМЖ), клеток стромы (эндотелия и фибробластов) и их комбинаций. Наблюдение за их ростом позволило выявить различия в поведении клеток при формировании сфероидов. Кроме того, было проведено тестирование чувствительности сфероидов из раковых и стромальных клеток и их смеси к цисплатину, определена IC50. Показана большая устойчивость смешанных сфероидов и раковых клеток в них к цитостатику при сокультивации. Проведено сравнение методов, определяющих жизнеспособность клеток, а именно флуоресцентной микроскопии и резазурин-теста. Полученные результаты расширяют понимание методов оценки жизнеспособности сфероидов, а также позволяют проводить исследования на трехмерных моделях опухолей с минимальными финансовыми и трудовыми затратами.

Финансирование работы

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 21-74-30016.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] H. Zahreddine, K.L.B. Borden. *Front. Pharmacol.*, **4**, 28 (2013). DOI: 10.3389/fphar.2013.00028
- [2] P. Pellegrini, J.T. Serviss, T. Lundbäck, N. Bancaro, M. Mazurkiewicz, I. Kolosenko, Di Yu, M. Haraldsson, P. D'Arcy, S. Linder, A. de Milito. *Cancer Cell Int.*, **18**, 147 (2018). DOI: 10.1186/s12935-018-0645-5
- [3] V.O. Shipunova, M.M. Belova, P.A. Kotelnikova, O.N. Shilova, A.B. Mirkasymov, N.V. Danilova, E.N. Komedchikova, R. Popovtzer, S.M. Deyev, M.P. Nikitin. *Pharmaceutics*, **14**, 5 (2022). DOI: 10.3390/pharmaceutics14051013
- [4] G. Blandino, F. Lo Sardo. *J. Thorac. Dis.*, **11** (Suppl 3), S461–S464 (2019). DOI: 10.21037/jtd.2018.11.17
- [5] G. Mehta, A.Y. Hsiao, M. Ingram, G.D. Luker, S. Takayama. *J. Control. Release*, **164** (2), 192–204 (2012). DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.04.045
- [6] S.J. Han, S. Kwon, K.S. Kim. *Cancer Cell Int.*, **21** (1), 152 (2021). DOI: 10.1186/s12935-021-01853-8
- [7] M. Kapałczyńska, T. Kolenda, W. Przybyła, M. Zajączkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Bliźniak, Ł. Łuczewski, K. Lamperska. *Arch. Med. Sci.*, **14** (4), 910–919 (2018). DOI: 10.5114/aoms.2016.63743
- [8] P.L. Olive, R.E. Durand. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84** (9), 707–711 (1992). DOI: 10.1093/jnci/84.9.707
- [9] S.-H. Kim, H.-J. Kuh, C.R. Dass. *Curr. Drug Discov. Technol.*, **8** (2), 102–106 (2011). DOI: 10.2174/157016311795563875
- [10] Y.-S. Torisawa, A. Takagi, H. Shiku, T. Yasukawa, T. Matsue. *Oncol. Rep.*, **13** (6), 1107–1112 (2005).
- [11] R.M. Bremnes, T. Dønnem, S. Al-Saad, K. Al-Shibli, S. Andersen, R. Sirera, C. Camps, I. Marinez, L.-T. Busund. *J. Thorac. Oncol.*, **6** (1), 209–217 (2011). DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd
- [12] M.P. Shekhar, J. Werdell, S.J. Santner, R.J. Pauley, L. Tait. *Cancer Res.*, **61** (4), 1320–1326 (2001).
- [13] M. Upreti, A. Jamshidi-Parsian, N.A. Koonce, J.S. Webber, S.K. Sharma, A.A. Asea, M.J. Mader, R.J. Griffin. *Transl. Oncol.*, **4** (6), 365–376 (2011). DOI: 10.1593/tlo.11187
- [14] N.N. Khodarev, J. Yu, E. Labay, T. Darga, C.K. Brown, H.J. Mauceri, R. Yassari, N. Gupta, R.R. Weichselbaum. *J. Cell Sci.*, **116** (6), 1013–1022 (2003). DOI: 10.1242/jcs.00281
- [15] M.J. Bissell, D. Radisky. *Nat. Rev. Cancer*, **1** (1), 46–54 (2001). DOI: 10.1038/35094059
- [16] W.-T. Dou, H.-H. Han, A.C. Sedgwick, G.-B. Zhu, Y. Zang, X.-R. Yang, J. Yoon, T.D. James, J. Li, X.-P. He. *Sci. Bull. (Beijing)*, **67** (8), 853–878 (2022). DOI: 10.1016/j.scib.2022.01.014
- [17] S. Bhaumik, J. Boyer, C. Banerjee, S. Clark, N. Sebastiao, E. Vela, P. Towne. *J. Cell. Biochem.*, **121** (12), 4974–4990 (2020). DOI: 10.1002/jcb.29827
- [18] A.S. Sogomonyan, V.O. Shipunova, V.D. Soloviev, V.I. Lariov, P.A. Kotelnikova, S.M. Deyev. *Acta Naturae*, **14** (1), 92–100 (2022). DOI: 10.32607/actanaturae.11603
- [19] I. Smyrek, B. Mathew, S.C. Fischer, S.M. Lissek, S. Becker, E.H.K. Stelzer. *Biol. Open*, **8** (1) (2019). DOI: 10.1242/bio.037051
- [20] M. Vinci, S. Gowan, F. Boxall, L. Patterson, M. Zimmermann, W. Court, C. Lomas, M. Mendiola, D. Hardisson, S.A. Eccles. *BMC Biol.*, **10**, 29 (2012). DOI: 10.1186/1741-7007-10-29
- [21] Y.L. Huang, C. Shiau, C. Wu, J.E. Segall, M. Wu. *Biophys. Rev. Lett.*, **15** (3), 131–141 (2020). DOI: 10.1142/s1793048020500034
- [22] V.O. Shipunova, V.L. Kovalenko, P.A. Kotelnikova, A.S. Sogomonyan, O.N. Shilova, E.N. Komedchikova, A.V. Zvyagin, M.P. Nikitin, S.M. Deyev. *Pharmaceutics*, **14** (1), (2021). DOI: 10.3390/pharmaceutics14010043
- [23] E.C. Costa, V.M. Gaspar, P. Coutinho, I.J. Correia. *Biotechnol. Bioeng.*, **111** (8), 1672–1685 (2014). DOI: 10.1002/bit.25210
- [24] S. Dasari, P.B. Tchounwou. *Eur. J. Pharmacol.*, **740**, 364–378 (2014). DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- [25] M.R. Müller, K.A. Wright, P.R. Twentyman. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **28** (4), 273–276 (1991). DOI: 10.1007/BF00685534
- [26] E.E. Petrova, T.I. Valyakina, M.A. Simonova, R.L. Komaleva, S.V. Khaidukov, E.A. Makarov, D.Y. Blokhin, P.K. Ivanov, T.M. Andronova, V.A. Nesmeyanov. *Int. Immunopharmacol.*, **6** (9), 1377–1386 (2006). DOI: 10.1016/j.intimp.2005.11.021
- [27] O.I. Hoffmann, C. Ilmberger, S. Magosch, M. Joka, K.-W. Jauch, B. Mayer. *J. Biotechnol.*, **205**, 14–23 (2015). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.02.029