

УДК 576.5

**Николаевич Л.Н.**, кандидат биологических наук, доцент**Згировская А.А.**, кандидат биологических наук**Борисовец Д.С.**, кандидат ветеринарных наук, доцент**Осипенко А.Е.**, младший научный сотрудник*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», г. Минск, Республика Беларусь*

## ФОРМИРОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ В КАЧЕСТВЕ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ПЛАТФОРМЫ (ОБЗОР)

### Резюме

В статье проведен обзор отечественной и зарубежной литературы, проанализированы различные методические протоколы формирования сфероидов в зависимости от типа культивируемых клеток и их использование в качестве клеточного субстрата для применения в биологии, медицине и ветеринарии.

**Ключевые слова:** многоклеточные сфероиды, методы исследований.

### Summary

The article reviews domestic and foreign literature and analyses various methodical protocols of formation of spheroids depending on the type of cultivated cells and their use as a cellular substrate for use in biology, medicine and veterinary science.

**Keywords:** multicellular spheroids, research methods.

Поступила в редакцию 01.04.2024 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Необходимым инструментом исследований в различных областях биологии и медицины является метод культуры клеток *in vitro*, который широко применяется в области биологии рака, фармацевтических и биохимических исследованиях, при разработке персонифицированных подходов в лечении и диагностике, а также создании биоимплантов. Однако используемый метод культивирования клеток в монослое имеет ряд существенных недостатков, таких как отсутствие органотипичности, сокращение межклеточных и отсутствие клеточно-матриксных взаимодействий, а также нарушение метаболических градиентов и т.д. Многие из этих проблем решаются при использовании трехмерных моделей – мультিকлеточных микросфер (сфероидов), которые в наибольшей степени отражают структурную организацию ткани. Кроме того, биохимические, метаболические и сигнальные пути в клетках в составе таких моделей наиболее активны по сравнению с 2D-моделями [1]. Благодаря пространственной структуре клеточные сфероиды гораздо лучше моделируют условия *in vivo*, в том числе прямые клеточные контакты, хими-

ческие сигналы и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом, что обеспечивает для образующих сфероиды клеток лучшую жизнеспособность и сохранение фенотипа, который зачастую утрачивается в клеточной культуре [2].

Ключевую роль в образовании сфероидов, как в эмбриональном развитии, так и в морфогенезе органов, играют молекулы клеточной адгезии. Можно выделить три стадии в процессе формирования сфероидов: на первой стадии клетки расположены рыхло; следующая стадия связана с постепенным накоплением E-кадгерина на поверхности клеток; на третьем этапе возникают кадгерин-кадгериновые межклеточные контакты и образуется плотный агрегат в форме сфероида [3]. Сфероиды – это плотно упакованные агрегаты клеток шарообразной формы [2]. Отличительными особенностями сфероидов являются сложная внутренняя структура, отражающая все виды межклеточных контактов, а также взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом; возможность формирования из разных типов клеток; способность к слиянию и образованию тканевых конструкций (матриц).

Первые упоминания о сфероидедах как об округлых многоклеточных микроагрегатах, формируемых опухолевыми клетками, относятся к 1971 г. [2]. Однако свое настоящее рождение сфероиды получили в конце XX – начале XXI века, после того, как, с одной стороны, к ученым пришло понимание, что трехмерная микросреда влияет на восприятие и интерпретацию клетками биохимических сигналов, что, в свою очередь, определяет тканевую и органную специфичность [3, 4], а с другой стороны, началось бурное развитие тканевой инженерии [5, 6]. В настоящее время сфероиды занимают прочное место в различных областях биологии и медицины, и с каждым годом спектр вопросов, для ответов на которые используются сфероиды, становится шире. Наиболее хорошо изученной областью применения сфероидов является регенеративная медицина [7]. Многими авторами научно обоснована эффективность использования сфероидов при восстановлении хряща [8], нервной ткани [9], костной ткани [10], пародонта [11], регенерации волосяных фолликулов [12], ускорении заживления кожных ран [13], лечения возрастной макулярной дегенерации [14]. Второй обширной, но гораздо менее изученной областью применения сфероидов является тканевая инженерия. Способность сфероидов к слиянию при непосредственном контакте друг с другом позволяет использовать их в качестве строительных блоков для создания более сложных структур [1]. Сформированные тканеинженерные конструкторы могут быть эффективно использованы для различных целей биомедицины, таких как моделирование заболеваний, тестирование лекарственных и косметических средств, трансплантация конструкторов взамен утраченных органов и тканей [15]. Использование сфероидов в качестве строительных блоков для тканевой инженерии является многообещающим направлением, требующим, с одной стороны, развития методов биофабрикации, а с другой – наличия систематического анализа биологических свойств сфероидов из различных типов клеток.

Еще одной областью внедрения сфероидов как перспективных исследовательских моделей является фармакология [16, 17]. Сфероиды используются для тестирования лекарственных соединений, исследования динамики их накопления в клетках,

анализа их цитотоксичности [18, 19]. Сфероиды, сформированные из опухолевых клеток, дополнительно применяются для оценки эффективности различных методов воздействия на опухоли [20]. Обсуждая очевидную перспективность использования сфероидов в качестве 3D-моделей в фармакологии, необходимо отметить, что полученные результаты в значительной степени зависят от множества факторов, включающих в себя морфометрические и морфологические характеристики используемых сфероидов и условия их культивирования. В связи с этим работы, направленные на развитие стандартизированных методов тестирования препаратов на сфероидедах, включая изучение взаимосвязи между биологическими свойствами сфероидов и наблюдаемой активностью лекарственных соединений, обладают несомненной актуальностью. В работе Szot C.S. et al. [21] были проведены сравнительные исследования свойств опухолевых клеток в монослое, 2D- и 3D-культурах после терапевтического воздействия противоопухолевыми лекарственными препаратами. Было установлено, что для подавления роста сфероидов требовались в 60 и более раз большие концентрации таких препаратов, как доцетаксел, цисплатин, гемцитабин, 5-флуороурацил, камптотецин, чем для клеток в монослое. Кроме того, при выявлении клеток в состоянии апоптоза (по экспрессии активированной каспазы-3) зафиксировано их меньшее количество в 3D-системе (в 2 и 2,5 раза для 5-флуороурацила и камптотецина соответственно), чем в монослойной культуре [21].

Данные, полученные авторами в работе [22], свидетельствуют о существенных отличиях между самими опухолевыми клетками в условиях монослоя и трехмерной культуры, где они связаны с экстраклеточным матриксом. Такая связь опухолевых клеток в 3D-моделях обуславливает их повышенную лекарственную устойчивость по сравнению с 2D-культурами, что свидетельствует о большей адекватности 3D-модели роста реальным условиям прогрессии опухоли в организме [22].

Метод получения трехмерных клеточных сфероидов, по мнению многих авторов [19–23], является универсальным инструментом для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соедине-

ний *in vitro*. В работе Л.Б. Даниловой с соавторами при сравнении 2D- и 3D-клеточных культур выявлены существенные различия между клетками, формирующими сфероиды, а именно клетки образуют особую среду с отличающимися от двумерных структур характеристиками (значением pH, наличием и концентрацией аутокринных факторов, концентрацией кислорода и CO<sub>2</sub>). При этом клетки в таком микроокружении обладают своей морфологией, способностью к дифференцировке и пролиферации, а также реакцией на различные стимулы, тем самым имитируя поведение *in vivo*. Эти свойства клеток в сфероиде важны для исследования действия различных препаратов, так как созданная среда ограничивает их проникновение, поэтому для достижения желаемого эффекта требуется увеличенная концентрация вещества [23, 24].

Несмотря на постоянно растущее количество работ, посвященных изучению сфероидов, данные об их биологических свойствах до сих пор очень разрозненны, так как получены разными научными группами на сфероидах различного размера и срока культивирования, что делает невозможным их сравнение между собой. Оригинальные статьи и обзоры, в которых бы проводилось стандартизированное сопоставление свойств сфероидов из разных типов клеток и выявление закономерностей их динамического поведения, отсутствуют.

Преимущества сфероидов как 3D-моделей для целей фармакологии и биомедицины уже ни у кого не вызывают сомнений [17]. Тем не менее данное направление содержит много проблем и открытых вопросов, наиболее значимый из которых – вопрос размера используемых сфероидов. Известно, что максимальное расстояние, на которое возможно проникновение кислорода и питательных веществ за счет пассивной диффузии в невакуляризованных тканях, составляет 100–200 мкм [25]. Из этого вытекает несколько важных следствий. Во-первых, с одной стороны, сфероиды с диаметром более 300–400 мкм могут содержать некротическую зону в центре [26], а с другой – короткий гипоксический стресс может оказывать стимулирующее воздействие на клетки, например активировать потенциал мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток [27]. Во-вто-

рых, проникновение лекарственных препаратов в сфероиды большого диаметра ограничено внешними слоями клеток [28]. В-третьих, гипоксия в центре сфероидов приводит к изменению pH среды, что влияет на активность pH-зависимых соединений [28]. Все эти факты необходимо учитывать при тестировании лекарственных соединений и интерпретации полученных результатов.

Таким образом, на основании всего вышеизложенного очевидно, что сфероиды являются перспективной моделью, подходящей как для фундаментальных исследований, так и для применения в различных областях биологии, медицины и ветеринарии.

В современной литературе описано множество способов формирования сфероидов из тех или иных типов клеток, и все они имеют общие этапы и принципы. Сфероиды получают из клеток, культивируемых предварительно в виде монослоя или суспензии. Клетки из первичного материала опухоли получают по стандартным методикам выделения клеток. Полную ростовую среду подбирают в зависимости от типа культивируемых клеток [7–10].

#### **Основные методические подходы формирования клеточных сфероидов**

**1. Использование низкоадгезивной посуды.** Самая популярная и удобная технология производства сфероидов основана на размещении клеток на поверхности с низкими адгезивными свойствами [7, 13]. Это могут быть микропланшеты с низкой адгезией и U-образным дном (например NunclonSphera) [3], агарозные планшеты, полученные с помощью специальных форм (3D PetriDishes, Microtissue, США) [7], либо обычная посуда, дно которой покрыто раствором агарозы [6, 7, 10]. В одном из возможных вариантов данной технологии из гидрогеля, чаще всего агарозы, создаются формы, в которые затем помещается суспензия клеток. Под действием силы тяжести клетки оседают на дно форм. Клетки не могут прикрепиться к неадгезивной поверхности, поэтому они вынуждены плотно взаимодействовать друг с другом и образовывать сфероиды. Принцип их использования сводится к высеванию клеток в оптимальной для конкретной линии концентрации в полную ростовую среду и культивации в CO<sub>2</sub> инкубаторе при темпе-

ратуре 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. Посевная плотность клеток сильно варьирует в зависимости от типа клеток и конкретной методики. Показано, что наивысшая плотность и округлость сфероидов из клеток линии HepG2 наблюдается при плотности посева 3000 клеток на лунку. Более высокая плотность посева приводила к неоднородным клеточным агрегатам, а также неблагоприятным изменениям формы и размера [19].

**2. Формирование сфероидов в системе «висячая капля».** Классический вариант метода висячей капли – простой и дешевый способ формирования сфероидов, не требующий покупки специального культурального пластика или реактивов. Суспензия клеток наносится в виде капель объемом 20–25 мкл на перевернутую крышку чашки Петри, после чего крышка переворачивается и аккуратно надевается на чашку Петри [17, 18]. Под действием силы тяжести клетки оседают на дно капель и формируют сфероиды. В каждой капле таким образом образуется по одному сфероиду. Данный метод позволяет четко контролировать количество клеток в каждой капле, а также получать сфероиды, состоящие из нескольких типов клеток. Однако в классическом варианте метод висячей капли является очень трудоемким, его невозможно автоматизировать и масштабировать [1, 14].

**3. Микрокапсулированные опухолевые сфероиды.** Метод основан на заключении клеточной суспензии в полупроницаемые альгинат-хитозановые микрокапсулы, которые в дальнейшем культивируются в виде суспензии в обычной полной ростовой среде и стандартных условиях [16]. Данный метод позволяет легко получать в достаточно большом количестве микрокапсулированные мультিকлеточные опухолевые сфероиды заданного диаметра с узким распределением по размерам. При этом можно получать сфероиды, состоящие из клеток, которые в суспензионной культуре вообще не способны формировать мультиклеточные агрегаты, следовательно, из них невозможно получить опухолевые сфероиды без микрокапсулирования. Кроме того, предложенный метод с использованием микрокапсулирования может позволить осуществлять совместное культивирование раковых клеток с другими типами клеток (фибробласты, эпителиальные клетки, макрофаги и др.) для получения более адекватной мо-

дели малых солидных опухолей *in vivo* по сравнению с классическими сфероидными [16]. Недостатками метода являются его сложность и необходимость наличия специальных реагентов и оборудования.

**4. Формирование мультиклеточных микросфер с использованием цикло-RGDfK (TRP) пептида.** В современной литературе большое внимание уделяется новому методу формирования сфероидов опухолевых клеток с использованием цикло-RGDfK (TRP) пептида. Данные литературных источников свидетельствуют о том, что синтетические циклические RGD-пептиды могут имитировать природные белки, найденные во внеклеточном матриксе, для облегчения формирования трехмерной модели опухоли [17]. Пептид RGDfK способствует самосборке раковых клеток без поверхностной адгезии на клеточной пластинке [18].

**5. Метод культивирования в полужидкой среде.** Этот метод используют для предотвращения неспецифической агрегации клеток и получения сфероидов – потомков одной клетки [19]. Методика аналогична описанной выше методике формирования сфероидов на низкоадгезивной посуде. Отличие состоит в том, что в полную ростовую среду добавляют 1 % метилцеллюлозы и клетки высевают в низкой концентрации (2300 клеток/мл) [20]. Метилцеллюлоза – это разновидность длинноцепочечных полисахаридов, которые могут способствовать образованию компактной сетки в жидкой суспензионной среде, ограничивающей движение отдельных клеток, но при этом достаточно мягкие, чтобы обеспечить формирование колоний [24]. Кроме того, разработаны разнообразные гели для удобства культивирования сфероидов, такие как GrowDex или Matrigel.

**Методические подходы исследования мультиклеточных сфероидов и клеток, диссоциированных из сфероида**

Сформированные сфероиды для удобства их визуализации переносят на посуду с обычным (адгезивным) покрытием на 24 ч, что позволяет оценить морфологию диссоциированных из сфероида клеток [25]. В некоторых случаях фиксация сфероидов проводится с использованием 10%-ного формалина [8], 4%-ного параформальдегида [10] и других методов, используемых также для культуры клеток. В

случае формирования микросфер в полужидкой среде для выделения сфероидов используются специальные растворители в соответствии с инструкцией к гелеобразующему препарату. Изучение состояния цельных клеточных сфероидов проводят по следующим критериям: 1) скорость образования сфероидов в динамике; 2) индекс эффективности сфероидообразования [26]; 3) оценка размеров сфероидов с помощью фотографирования [27]; 4) оценка цитотоксичности по относительной жизнеспособности клеток; 5) расчет коэффициента формы, описывающей сферичность агрегатов [30]; 6) морфология клеток, составляющих сфероид [29].

Для анализа клеток, составляющих мультиклеточный сфероид, используются те же методы, что и для обычной культуры клеток. В литературе описаны такие методы, как иммунофенотипический анализ поверхностных CD-маркеров с использованием проточной цитофлуориметрии и анализ жизнеспособности клеток методом МТТ-теста. Однако рядом авторов установлено, что клетки в составе трехмерной структуры значительно отличаются от клеток, культивируемых в монослое, не только по форме, но и интенсивностью пролиферации, устойчивостью к воздействию на них различных препаратов, уровнем дифференциации, а также экспрессией различных генов (фенотипически) [22–25]. Для диссоциации клеток из сфероида исполь-

зуют раствор аккутазы либо 0,05%-ный трипсин и ЭДТА. Изучают пролиферативную активность клеток, формирующих сфероиды. Индекс пролиферации рассчитывают как отношение числа клеток, составляющих клеточные сфероиды в данный момент, к исходному числу клеток. Исходным считают число клеток в сфероидах, образовавшихся через 18–20 ч после перевода монослойной культуры в 3D-условия и состоявших из плотно упакованных клеток. Анализ пролиферативной активности проводят через 24 и 48 ч после образования сфероидов [22, 29]. Также анализируют клоногенную выживаемость и частоту апоптотических клеток, выделенных из сфероидов методом проточной цитометрии [25].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культивирование клеток в 3D-формате является современным и обоснованным методом исследований *in vitro*. Гибкость и разнообразие методик позволяют подобрать оптимальные протоколы для любых исследований в культуре клеток, а биологическая структура мультиклеточных сфероидов обеспечивает максимальное приближение к исследованиям *in vivo* за счет обеспечения межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, а также приближения метаболического градиента к естественному для органной структуры.

### СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. *Organ printing: Tissue spheroids as building blocks* / V. Mironov [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – Vol. 30, № 12. – P. 2164–2174.
2. *Создание трехмерных клеточных моделей для решения теоретических и практических задач современной онкологии* / Е. А. Просекин [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2019. – Т. 65, № 5. – С. 629–637.
3. *Способ получения сфероидов клеток НераRG в среде без диметилсульфоксида* : пат. RU 2661105 / Д. А. Сахаров, О. А. Бурмистрова, А. Г. Тоневицкий. – Оpubл. 21.01.2016.
4. *Формирование мультиклеточных сфероидов в культурах клеток надпочечников поросят разного возраста* / Е. М. Ушакова [и др.] // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2018. – Вип. 1, т. 1 (142). – С. 79–83.
5. *Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering* / V. Mironov [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, № 4. – P. 157–161.
6. *Engineering biological structures of prescribed shaped using self-assembling multicellular systems* / K. Jakab [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – Vol. 101, № 9. – P. 2864–2869.
7. *The utility of biomedical scaffolds laden with spheroids in various tissue engineering applications* / S. J. Chae [et al.] // *Theranostics*. – 2021. – Vol. 11, № 14. – P. 6818–6832.
8. *One-year clinical and radiological results of a prospective, investigator-initiated trial examining a novel, purely autologous 3-Dimensional autologous chondrocyte transplantation product in the knee* / S. Fickert [et al.] // *Cartilage*. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 27–42.

9. Tseng, T. C. *Substrate-mediated nanoparticle/gene delivery to MSC spheroids and their applications in peripheral nerve regeneration* / T. C. Tseng, S. hui Hsu // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, № 9. – P. 2630–2641.
10. *Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids* / H. Suenaga [et al.] // *J Mater Sci Mater Med*. – 2015. – Vol. 26, № 11. – P. 254.
11. *Co-cultured spheroids of human periodontal ligament mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells enhance periodontal tissue regeneration* / K. Sano [et al.] // *Regen Ther*. – 2020. – Vol. 14. – P. 59–71.
12. *Scalable production of controllable dermal papilla spheroids on PVA surfaces and the effects of spheroid size on hair follicle regeneration* / Y. C. Huang [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34, № 2. – P. 442–451.
13. *Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing* / J. M. Santos [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. 90.
14. *Первый опыт трансплантации 3D-сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте* / С. А. Борзенко [и др.] // *Офтальмохирургия*. – 2019. – Vol. 1. – P. 27–32.
15. *Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues* / E. Fennema [et al.] // *Trends Biotechnol*. – 2013. – Vol. 31, № 2. – P. 108–115.
16. *Underhill, G. H. Bioengineered liver models for drug testing and cell differentiation studies* / G. H. Underhill, S. R. Khetani // *CMGH*. – 2018. – Vol. 5, № 3. – P. 426–439.
17. *Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine* / Z. Gilazieva [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12, № 10. – P. 2727.
18. *Han, S. J. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase* / S. J. Han, S. Kwon, K. S. Kim // *Cancer Cell Int*. – 2021. – Vol. 21, № 1. – P. 152.
19. *Сфероиды НЕК2-положительной аденокарциномы молочной железы человека как модель для тестирования противоопухолевых иммунотоксинов* / И. В. Балалаева [et al.] // *Acta Naturae*. – 2017. – Vol. 9, № 1 (32). – P. 40–46.
20. *Fabrication and evaluation of nanocontainers for lipophilic anticancer drug delivery in 3D in vitro model* / T. Borodina [et al.] // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2021. – Vol. 109, № 4. – P. 527–537.
21. *3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels* / C. S. Szot [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 7905–7912.
22. *Elliott, N. T. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies* / N. T. Elliott, F. Yuan // *J Pharm. Sci*. – 2011. – Vol. 100. – P. 59–74.
23. *Метод получения трехмерных клеточных сфероидов: универсальный инструмент для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соединений in vitro* / А. С. Согомонян [и др.] // *ACTA NATURAE*, 2022. – Т. 14, № 1 (52). – С. 92–100.
24. *Данилова, А. Б. Оценка эффективности использования тумороидов для индивидуального подбора лекарственной терапии солидных опухолей* / А. Б. Данилова [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 815–828.
25. *Foty, R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids* / R. Foty // *J Vis Exp*. – 2011. – № 51. – P. 2720.
26. *Engineering vascularized tissue* / R. K. Jain [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 2005. – Vol. 23, № 7. – P. 821–823.
27. *Optical coherence tomography detects necrotic regions and volumetrically quantifies multicellular tumor spheroids* / Y. Huang [et al.] // *Cancer Res*. – 2017. – Vol. 77, № 21. – P. 6011–6020.
28. *Андреева, Е. Р. Гипоксический стресс как индуктор активации потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток* / Е. Р. Андреева, М. В. Погодина, Л. Б. Буравкова // *Физиология человека*. – 2015. – Т. 41, № 2. – P. 123–129.
29. *Данилова, А. Б. Разработка и характеристика трехмерных клеточных моделей для индивидуализации лечения онкологических больных* / А. Б. Данилова, Е. А. Нехаева, Н. А. Ефремова // *Сибирский онкологический журнал*. – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 58–74.
30. *Микрокапсулированные мультиклеточные опухолевые сфероиды: получение и использование в качестве модели in vitro для тестирования лекарств* / А. М. Цой [и др.] // *Биомедицинская химия*. – 2010. – Т. 56, вып. 6. – С. 674–685.