

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК В АЛЬГИНАТНЫХ КАПЛЯХ, КАК ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ ДЛЯ БИОПЕЧАТИ

С. Ю. Филиппова, Т. В. Чембарова✉, С. В. Тимофеева, И. В. Межевова, Н. В. Гненная, И. А. Новикова, Т. О. Лаптева

НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ tanyshamova@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Тестирование протокола получения клеточных сфероидов культур рака молочной железы (PMЖ) для биопечати путём наращивания в альгинатных каплях.

Материалы и методы. Клетки культур BT-20 и MDA-MB-453 культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % FBS. Далее клетки снимали с пластика при помощи раствора трипсин-Версена и ресуспендировали в стерильном 2 % растворе альгината, приготовленном на DPBS, до концентрации 10^5 кл/мл. Раствор альгината с клетками исследуемых культур PMЖ медленно капали через иглу 30G в стерильный охлажденный раствор хлорида кальция (100 мМ) с высоты 10 см. После полимеризации альгинатные капли отмывали в среде DMEM и культивировали в течение двух недель в среде DMEM с добавлением 10 % FBS при 37 °С и 5,0 % CO₂. Образующиеся в альгинате сфероиды фотографировали на 3-, 7-, 10- и 14-е сутки культивирования, после чего их извлекали из альгината путём выдерживания в 55мМ растворе цитрата натрия с добавлением 20мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и заключали в парафиновые блоки по стандартной методике с последующим гистологическим исследованием.

Результаты. Клеточные сфероиды-клоны образовывались в обеих культурах уже на 3 сутки культивирования. С 3 по 10-е сутки в обеих культурах наблюдался равномерный рост клеточных сфероидов с постепенным замедлением увеличения размеров сфероидов к 14-му дню культивирования. Доля клеток, образовавших клоны (размером более 500 мкм²), на 10-е сутки составила 25,2 % ± 7,1 % (n = 25) в культуре BT-20 и 38,5 % ± 9,9 % (n = 25) в культуре MDA-MB-453. На 14-е сутки для BT-20 были характерны сфероиды, мало варьирующие по размеру и форме, средней площадью 1652 ± 175 мкм², обладающие плотной структурой с ровными краями. Сфероиды из клеток культуры MDA-MB-453 оказались более рыхлыми и легко деформирующимися, их размеры и форма заметно варьировали, средняя площадь сфероидов составила 2785 ± 345 мкм².

Заключение. Получение сфероидов в альгинатных каплях уступает по скорости методам формирования клеточных конгломератов в висячих каплях или на микрочаечках, однако превосходит эти методы по производительности, которая сравнима с получением сфероидов на низкоадгезивных подложках путём постоянного перемешивания среды. Кроме того, клonalная природа получаемых сфероидов приводит к увеличению затрат на проведение исследований и ограничивает, тем самым, их масштабируемость.

Ключевые слова: трёхмерная клеточная культура, клеточный сфероид, альгинат, биопечать

Для цитирования: Филиппова С. Ю., Чембарова Т. В., Тимофеева С. В., Межевова И. В., Гненная Н. В., Новикова И. А., Лаптева Т. О. Культивирование клеток в альгинатных каплях, как высокопроизводительный метод получения клеточных сфероидов для биопечати. Южно-Российский онкологический журнал. 2023; 4(2): 47-55. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2023-4-2-5>, <https://elibrary.ru/foottt>

Для корреспонденции: Чембарова Татьяна Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63

E-mail: tanyshamova@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4555-8556>

SPIN: 5426-1873, AuthorID: 1051985

ResearcherID: AAR-3198-2021

Scopus Author ID: 57221303597

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Статья поступила в редакцию 18.01.2023; одобрена после рецензирования 31.03.2023; принята к публикации 05.06.2023.

© Филиппова С. Ю., Чембарова Т. В., Тимофеева С. В., Межевова И. В., Гненная Н. В., Новикова И. А., Лаптева Т. О., 2023

CULTIVATION OF CELLS IN ALGINATE DROPS AS A HIGH-PERFORMANCE METHOD OF OBTAINING CELL SPHEROIDS FOR BIOPRINTING

S. Yu. Filippova, T. V. Chembarova✉, S. V. Timofeeva, I. V. Mezhevova, N. V. Gnennaya, I. A. Novikova, T. O. Lapteva

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ tanyshamova@mail.ru

ABSTRACT

Purpose of the study. Testing the protocol of obtaining cell spheroids of breast cancer cell cultures for bioprinting by growing in alginate drops.

Materials and methods. Cells of breast cancer cell lines BT-20 and MDA-MB-453 were cultured in DMEM medium supplemented with 10 % FBS. Next, the cells were removed from the plastic using a trypsin-Versene solution and resuspended in a sterile 2 % alginate solution in DPBS to the concentration of 10^5 cells/ml. Then the alginate solution with the cells was slowly dripped through a 30G needle into a sterile cooled solution of calcium chloride (100 mM) from a height of 10 cm. After polymerization, alginate drops were washed in DMEM and cultured for two weeks in DMEM with the addition of 10 % FBS at 37 °C and 5.0 % CO₂. The spheroids formed in the alginate were photographed on the 3rd, 7th, 10th, and 14th days of cultivation, after which they were removed from the alginate by keeping in 55 mM sodium citrate solution with the addition of 20mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and embedded in paraffin blocks according to the standard method, followed by histological examination.

Results. Cellular spheroids were formed in both cell cultures already on the 3rd day of cultivation. From the 3rd to the 10th day in both cultures, a uniform growth of cell spheroids was observed with a gradual slowdown in the increase in the size of spheroids by the 14th day of cultivation. On the 10th day the proportion of cells that formed clones (more than 500 μm² in size) was 25.2 % ± 7.1 % (n = 25) in the BT-20 culture and 38.5 % ± 9.9 % (n = 25) in MDA-MB-453 culture. On the 14th day, BT-20 culture was characterized by spheroids varying little in size and shape, with an average area of 1652 ± 175 μm², having a dense structure with smooth edges. The spheroids in MDA-MB-453 culture turned out to be more loose and easily deformed, their size and shape varied noticeably, the average area of the spheroids was 2785 ± 345 μm².

Conclusion. The production of spheroids in alginate drops is inferior in speed to the methods of forming cell conglomerates in hanging drops or on microwells, but it surpasses these methods in productivity, which is comparable to the production of spheroids by constant medium stirring on low-adhesive substrates. In addition, the clonal nature of the obtained spheroids leads to an increase in research costs and thus limits their scalability.

Keywords: 3D cell culture, cell spheroid, alginate, bioprinting

For citation: Filippova S. Yu., Chembarova T. V., Timofeeva S. V., Mezhevova I. V., Gnennaya N. V., Novikova I. A., Lapteva T. O. Cultivation of cells in alginate drops as a high-performance method of obtaining cell spheroids for bioprinting. South Russian Journal of Cancer. 2023; 4(2): 47-55. (In Russ.). <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2023-4-2-5>, <https://elibrary.ru/foottt>

For correspondence: Tatiana V. Chembarova – junior research fellow at the laboratory of cell technologies, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation.
Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation
E-mail: tanyshamova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4555-8556>
SPIN: 5426-1873, AuthorID: 1051985
ResearcherID: AAR-3198-2021
Scopus Author ID: 57221303597

Funding: this work was not funded.

Conflict of interest: the authors declare that there are no obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

The article was submitted 18.01.2023; approved after reviewing 31.03.2023; accepted for publication 05.06.2023.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) остаётся актуальной проблемой современного здравоохранения [1; 2]. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения в России РМЖ занимает первое место [3; 4], на его долю в 2021 г. пришлось 22,1 % новых случаев, а среднегодовой темп прироста заболеваемости с 2011 по 2021 гг. составил 1,72 %. По показателю смертности эта онкопатология также занимает первое место среди злокачественных заболеваний у женщин – на долю РМЖ в 2021 г. пришлось 15,8 % всех смертей от рака [5]. Сокращение смертности зависит от разработки и внедрения новых лекарственных препаратов и подходов к лечению опухоли. Несмотря на прогресс в области открытия новых противоопухолевых агентов, лишь небольшая часть веществ, продемонстрировавших эффективность в доклинических исследованиях на клеточных культурах и животных моделях, успешно проходит клинические испытания. Учёные сходятся во мнении, что основной причиной такого положения дел является несоответствие биологических особенностей монокультур клеток и опухолей, выращенных в животных моделях особенностям опухолей человека [6]. В частности, известно, что культивирование клеток рака в двумерных культурах приводит к изменению их фенотипа и потере экспрессии молекул ключевых сигнальных путей, которую эти клетки демонстрируют в естественных условиях в организме больных [7]. В связи с этим, актуальным является создание новых моделей опухолевого роста, которые бы сочетали в себе массовость и воспроизводимость, характерные для клеточных культур *in vitro*, и комплексность, демонстрируемую животными моделями. Одним из перспективных направлений поиска является воссоздание трёхмерного микроокружения опухоли *in vitro* путём соединения различных компонентов с помощью методов биопечати [8]. Исследователи используют различные материалы и подходы к конструированию таких моделей, но в общем случае они представляют собой злокачественные клетки и клетки микроокружения, заключенные в биогели разной химической природы и происхождения. При этом, чаще всего клетки располагаются в толще биочернил поодиночке, на расстоянии, существенно превосходящем наблюдаемое *in situ* [8]. Такое строение модели, очевидно, не позволяет в полной мере отразить биологические особенности опухоли, поэтому предпринимаются попытки ввести в биопечатные конструкции клеточные

сфероиды – простейшие модели опухолевых узлов, хорошо зарекомендовавшие себя в практике доклинических исследований [9]. Как правило, клеточные сфероиды для биопечати получают методами механической агломерации клеток путём подвешивания клеточной суспензии в каплях, использования мелкоячеистых планшет или специальных матриц, культивирования на низкоадгезивном субстрате с постоянным перемешиванием среды, а также путём прямого впечатывания биогеля с высокой концентрацией клеток в матрикс модели [10]. Одним из наименее распространённых подходов к получению клеточных сфероидов для биопечати является их выращивание из одиночных клеток-предшественников. Однако полученные именно таким способом сфероиды, по нашему мнению, являются более адекватными моделями микрометастазов или ранних стадий образования опухолевых узлов, чем механические конгломераты клеток, так как каждый клеточный сфероид в этом случае является клоном одной клетки. Кроме того, модель опухоли, собранная из отдельных клонов, в большей степени соответствует строению, наблюдаемому в гетерогенной опухоли *in situ*. Как правило, сфероиды-клоны получают путём культивирования клеток опухоли в биогеле, не поддерживающем адгезию клеток. Наиболее популярным биогелем для получения сфероидов является мягкий агар или гели из агарозы, которые традиционно используются исследователями для оценки количества опухолевых стволовых клеток (ОСК) в культуре [11]. Однако для получения сфероидов, пригодных для биопечати, данный метод неприменим, так как извлечение клеток из агарозного геля связано с нагревом и механическим воздействием, из-за чего их жизнеспособность снижается. Мы предположили, что в качестве перспективного метода получения сфероидов для биопечати можно рассмотреть инкапсуляцию клеток в альгинатные капли. Ранее данный подход был опробован нами для исследования свойств стволовости в адгезионных клеточных линиях колоректального рака [12]. Альгинатный гель, как и агароза, не поддерживает адгезию, но его преимуществом при этом является способность к быстрой деполимеризации под действием агентов, хелатирующих ионы кальция, что позволяет быстро извлекать полученные сфероиды при физиологических условиях и далее использовать их в биопечати. Анализ данных литературы показал, что подход, в основе которого лежит наращивание сфероидов в альгинате с последующим очищением и заключением биогель, ещё никем не

был применён. В отдельных работах встречается биопечать модели опухоли единичными клетками в альгинатно-желатиновом биогееле с последующим образованием сфероидов-клонов непосредственно в полученной конструкции [13]. В отличие от предлагаемого нами подхода, данный способ включения сфероидов в модель не даёт возможности широко варьировать состав биочернил, а также не позволяет точно регулировать состав и расположение других элементов модели.

Цель исследования: разработка и тестирование протокола получения сфероидов культур РМЖ для биопечати путём наращивания в альгинатном геле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили клеточные культуры РМЖ BT-20 и MDA-MB-453. Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco) с добавлением 10 % FBS (Hyclone). При достижении монослоем клеток 70 %-ной конфлюентности их снимали с пластика при помощи раствора трипсин-Версена (1:1; Биолот, Россия). Далее клетки ресуспендировали в стерильном 2 % растворе альгината (Sigma), приготовленном на DPBS (Биолот), до концентрации 10^5 кл./мл. Раствор альгината с клетками исследуемых культур РМЖ медленно капали через иглу 30G в стерильный охлажденный раствор хлорида кальция (100 мМ) с высоты 10 см. При соприкосновении с раствором хлорида кальция происходило мгновенное отверждение каплей альгината и образование бусин диаметром 2,5–3 мм (рис. 1). Полу-

ченные бусины выдерживали для дополимеризации в растворе хлорида кальция ещё 5 мин и отмывали один раз охлажденной средой DMEM, после чего помещали в среду культивирования, состоящую из DMEM с добавлением 10 % FBS. Далее альгинатные бусины с заключенными в них клетками культур РМЖ культивировали 14 суток с заменой среды через каждые трое суток. Образующиеся в альгинате сфероиды фотографировали на 3-, 7-, 10- и 14-е сутки культивирования. На полученных снимках определяли размер сфероидов при помощи средств пакета ImageJ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием ПО MS Excel.

На 14-е сутки культивирования проводили растворение альгината путём выдерживания бусин в 55мМ растворе цитрата натрия с добавлением 20мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в течение 3 минут при комнатной температуре. Выделенные сфероиды дважды отмывали в среде культивирования и помещали в 5 % агарозный гель, который после отверждения заключали в парафиновый блок по стандартной методике. Исследование гистологической структуры полученных клеточных сфероидов проводили на срезах, окрашенных гематоксилином-эозином.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обе клеточные культуры в а альгинатных каплях продемонстрировали рост уже на третьи сутки культивирования. При этом культура BT-20 образыва-



Рис. 1. Схематическое представление протокола получения клеточных сфероидов в альгинатных каплях.

ла примерно одинаковые по размерам сфероиды округлой формы, в то время как клетки культуры MDA-MB-453 формировали разные по форме и размерам сфероиды (рис. 2а, б). Разница в характере роста сфероидов сохранилась и на 10-е сутки культивирования (рис. 2в, г).

Вариативность в размерах и форме сфероидов может быть негативным явлением для тех приложений биопечати, в которых требуется измерение размеров сфероидов в составе получаемого конструкта в ответ на различные воздействия. Как, например, это требуется в случае биопечати модели опухолевого роста. Если сравнивать с другими способами формирования сфероидов, то предлагаемый нами метод уступает по данному показателю методам прямого впечатывания густой суспензии клеток в матрикс модели и методам контролируемой агрегации клеток в висячих каплях или микролунках, но сравним со свободно плавающими сфероидами-конгломератами на низкоадгезивных субстратах [4]. Для преодоления данного недостатка можно предложить использование различных ме-

тодов сепарации (фильтрация, центрифугирование) сфероидов-клонов по размерам перед печатью или применение для анализа получаемых моделей автоматических микроскопов с точным позиционированием предметного столика, что позволит учитывать поведение каждого сфероида в отдельности.

С 3 по 10-е сутки культивирования в обеих культурах наблюдался равномерный рост клеточных сфероидов с постепенным замедлением увеличения размеров сфероидов к 14-му дню культивирования. При этом в среднем, размер сфероидов MDA-MB-453 был больше, чем у BT-20 (рис. 3). Для BT-20 были характерны сфероиды средней площадью $1652 \pm 175 \text{ мкм}^2$, а средняя площадь сфероидов, образованных клетками культуры MDA-MB-453 составила $2785 \pm 345 \text{ мкм}^2$. Данное явление можно объяснить полуадгезионным характером роста культуры MDA-MB-453 на культуральном пластике, что даёт клеткам этой культуры преимущество и в условиях выращивания в альгинатном геле, не поддерживающем клеточную адгезию.

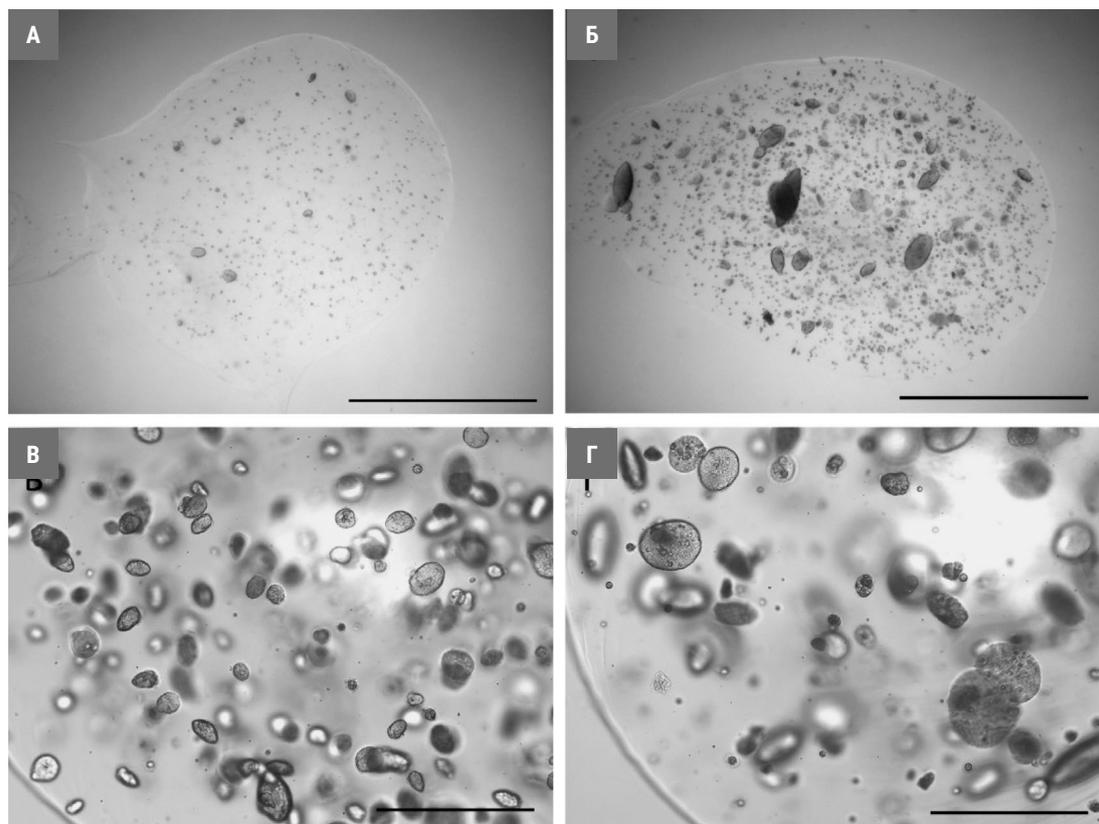


Рис. 2. Бусины из 2 % альгинатного геля с заключенными в них клетками культур рака молочной железы; а – культура BT-20 на 3-е сутки культивирования; б – культура MDA-MB-453 на 3-е сутки культивирования; в – культура BT-20 на 10-е сутки культивирования; г – культура MDA-MB-453 на 10-е сутки культивирования. Размер масштабных линеек: а, б – 3 мм; в, г – 0,5 мм.

Таким образом, оптимальное время для сбора сфероидов с целью дальнейшей биопечати для данных культур составляет 7–10 суток культивирования. Такая скорость формирования сфероидов сравнима со свободноплавающими сфероидо-конгломератами на низкоадгезивных субстратах, но значительно уступает скорости формирования клеточных сфероидов при контролируемой агрегации клеток в висячих каплях или микролунках, где данный показатель может составлять от 3 до 48 часов в зависимости от применяемых материалов [10].

На 10-е сутки культивирования, когда увеличение размеров сфероидов начинает стабилизироваться, и можно переходить к биопечати, мы провели измерения доли клеток, образовавших клоны (размером более 500 мкм²). Анализ данных показал, что этот показатель составил 25,2 % ± 7,1 % ($n = 25$) в культуре BT-20 и 38,5 % ± 9,9 % ($n = 25$) в культуре MDA-MB-453. Таким образом, при концентрации 100 тыс клеток/мл, из одного миллилитра альгинатного геля с клетками культур BT-20 и MDA-MB-453 можно получить 25–38 тысяч подходящих для дальнейшей биопечати сфероидов, что на порядки больше, чем возможности даже высокопроизводительных методов формирования сфероидов в микролунках и висячих каплях и сравнимо с производительностью формирования свободноплавающих сфероидо-конгломератов на низкоадгезивных субстратах [10]. Выход клеточных сфероидов и скорость их роста могут быть увеличены ещё больше, если применять такие факторы роста, усиливающие деление клеток в условиях пониженной адгезии, как EGF и FGF [12].

Гистологическое строение сфероидов после извлечения из альгинатного геля отличалось между

культурами. Для BT-20 были характерны сфероиды плотной структуры с ровными краями, сохраняющие свою форму после извлечения из геля, двукратной отмывки и включения в агарозный блок (рис. 4а). Сфероиды из клеток культуры MDA-MB-453 оказались более рыхлыми, легко деформируемыми с потерей части клеток из поверхностных слоёв после отмывки в среде культивирования (рис. 4б). Наблюдаемые различия могут быть связаны с меньшим количеством внеклеточного матрикса, образуемого клетками культуры MDA-MB-453 в сравнении с культурой BT-20.

Структура сфероидов играет важную роль в биопечати. Рыхлые распадающиеся клеточные конгломераты при экструзии через сопло теряют форму, что негативно сказывается на качестве результатов измерений, проведенных на полученной путём биопечати с использованием таких сфероидов 3D модели опухолевого роста. Клеточные конгломераты, полученные методом агрегации в висячей капле, как правило, обладают очень плотной структурой и механической прочностью [14], как и сфероиды, полученные в микропланшетах [10], что выгодно отличает эти подходы от предлагаемого нами. В то же самое время, свободноплавающие сфероиды-конгломераты на низкоадгезивных субстратах, сравнимы или ещё более уступают в прочности сфероидо-клонам, полученным нами. Подбор клеточных культур, выделяющих большое количество молекул внеклеточного матрикса (коллаген, ламинин, гиалуроновая кислота и другие), вероятно, будет способствовать улучшению практики получения сфероидов в альгинатных каплях с необходимыми для нужд биопечати характеристиками плотности и прочности.

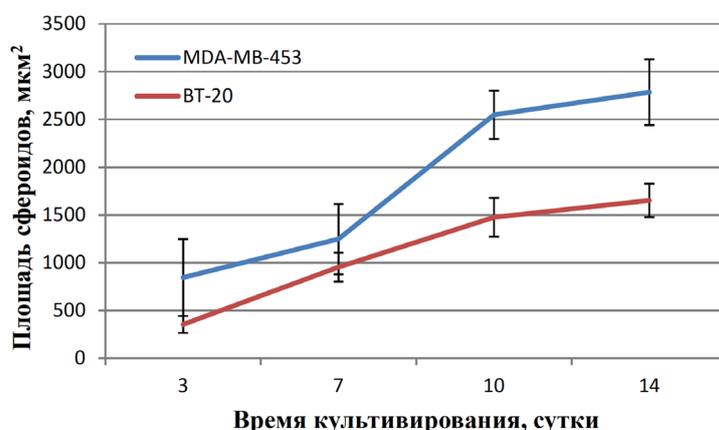


Рис. 3. Динамика роста клеточных сфероидов, образуемых в 2 % альгинатном геле клетками культур BT-20 и MDA-MB-453. Данные представлены, как выборочное среднее значение ± 95 % доверительный интервал генерального среднего.

Характерной чертой сфероидов, полученных нами из клеток обеих культур, было отсутствие центральной области апоптоза/некроза, что, вероятно, объясняется их малыми размерами. Известно, что первые признаки клеточного повреждения под действием гипоксии и недостатка питательных веществ начинают проявляться в центре сфероидов по достижении их радиуса 100 мкм и более [15], в нашем же случае радиус даже самых крупных клеточных сфероидов не превышал 30 мкм. На настоящий момент установлено, что адаптация злокачественных клеток и клеток микроокружения к недостатку питательных веществ и кислорода, наблюдаемых в опухоли, способствует развитию химио- и радиорезистентности, иммуносупрессии, инвазии и метастазированию, являясь одним из важнейших препятствий на пути лечения рака [16]. В связи с этим, воспроизведение гипоксии и дефицита питательных веществ в биопечатной модели рака обладает особой ценностью. Крупные клеточные сфероиды являются основным материалом, на котором изучают гипоксию *in vitro*, однако из-за их размеров биопечать методом экструзии через тонкое сопло такими структурами не представляется возможной. Поэтому в таких моделях чаще используют прямое впечатывание суспензии клеток в биогель или сочетание методов преформирования достаточно крупных клеточных конгломератов с последующей заливкой в биогель [15]. Небольшие сфероиды, наподобие тех, которые мы получили путём культивирования клеток культур MDA-MB-453 и BT-20 в альгинатных каплях, служат хорошим материалом для биопечати, но не демон-

стрируют признаков гипоксии. Поэтому в данном случае моделирование естественных дефицитов, существующих в опухоли, будет осуществляться не на уровне отдельных сфероидов, а на уровне всей модели, где различные градиенты могут создаваться путём контроля состава компонентов модели и их точного позиционирования относительно друг друга и источников питательных веществ и газов.

В культуре клеток MDA-MB-453, выращенной в альгинатных каплях, встречались отдельные сфероиды разных размеров с признаками деградации клеточных ядер (рис. 4б, выделение), свидетельствующими о начинающихся процессах клеточной гибели. Это явление наряду с неравномерным распределением по размерам и форме образуемых сфероидов, может говорить о выраженной гетерогенности клонов, образуемых культурой MDA-MB-453 в данных условиях культивирования. Гетерогенность принципиально неустранима, если речь идёт о сфероидах-клонах, и является определённым вызовом для моделирования опухолевого роста *in vitro* с использованием таких структур. В случае с многоклеточными конгломератами, полученными путём механического соединения клеток (метод висячей капли или формирование сфероидов в ячейках) каждый такой сфероид совмещает в себе различные по биологическим характеристикам клетки, в результате чего разница между такими клеточными конгломератами становится несущественной. Поэтому каждый многоклеточный сфероид может считаться экспериментальным повтором. В случае со сфероидами-клонами отдельным экспериментальным повтором следует считать не

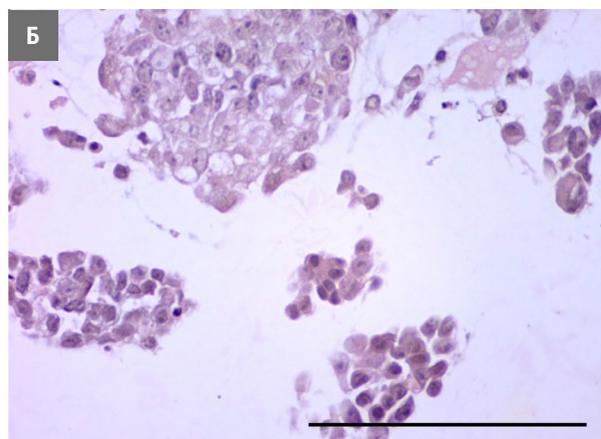
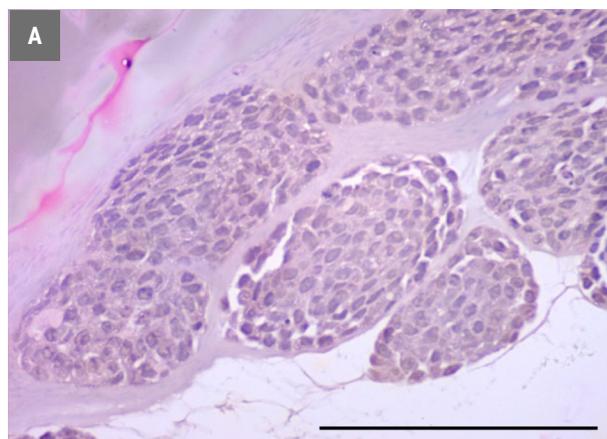


Рис. 4. Сфероиды, образуемые клетками культур рака молочной железы в 2 % альгинатном геле на 14-е сутки культивирования. а – культура BT-20, б – культура MDA-MB-453. Окрашивание гематоксилином-эозином.

каждый сфероид, но их некоторую совокупность, что необходимо учитывать при проектировании модели опухолевого роста, включающей в свой состав такие структуры. Таким образом, для получения достоверных результатов эксперимента сфероидов-клонов требуется в десятки раз больше, что увеличивает траты на проведение исследований и ограничивает, тем самым, их масштабируемость.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение инкапсуляции в альгинатный гель позволяет получить в короткий срок большое количество клеточных сфероидов-клонов, пригодных для биопечати. Тестируемый нами метод уступает методам агломерации клеток в висячей капле и на

микрочайках по скорости формирования сферидов, а также плотности и однородности получаемых структур, однако превосходит эти методы по производительности, которая сравнима с методом получения клеточных сфероидов путём культивирования на низкоадгезионных субстратах при постоянном перемешивании среды. Клональная природа сфероидов, выращенных в альгинатных каплях, несколько увеличивает траты на проведение исследований с использованием моделей полученных на их основе по сравнению с другими подходами. Однако такие сфериды, по нашему мнению, являются наилучшим материалом для построения, например, биопечатных моделей развития микрометастазов – структур, по своей природе также являющихся клонами одной клетки.

Список источников

1. Афонин Г. В., Рагулин Ю. А., Гулидов И. А. Ускоренные режимы адьювантной лучевой терапии в лечении рака молочной железы. Исследования и практика в медицине. 2017;4(3):66–74. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2017-4-3-6>, EDN: ZGIHQH
2. Балыкова Л. А., Инчина В. И., Тарасова Т. В., Мосина Л. М., Гвоздиков Е. Н., Хайдар Д. А. и др. Эффективность липосомального доксорубина гидрохлорида в комбинации с циклофосфаном в лечении рака молочной железы в эксперименте. Исследования и практика в медицине. 2021;8(4):23–32. <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2021-8-4-2>, EDN: ALOTUB
3. Ройтберг Г. Е., Дорош Ж. В., Анисеева О. Ю. Лечение трижды негативного рака молочной железы у пациентки с метаболическим синдромом. Исследования и практика в медицине. 2021;8(1):62–68. <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2021-8-1-6>, EDN: НКVAWJ
4. Зубарева Е. Ю., Сеньчукова М. А., Вирич Е. В., Зубарев М. Р., Гончарова М. А. Уровни HIF-1 α и TGF- β 1 в сыворотке крови в зависимости от клинико-морфологических характеристик и чувствительности рака молочной железы к неоадьювантной химиотерапии. Исследования и практика в медицине. 2021;8(4):53–64. <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2021-8-4-5>, EDN: GLUUQD
5. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2021, 252 с. Доступно по: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/11/zis-2020-elektronnaya-versiya.pdf>, Дата обращения: 29.12.2022.
6. Галимова Э. С., Галагудза М. М. Двухмерные и трехмерные модели культур клеток опухолей *in vitro*: преимущества и недостатки. Бюллетень сибирской медицины. 2018;17(3):188–196. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-188-196>, EDN: VJUNHB
7. Кит О. И., Шатова Ю. С., Новикова И. А., Владимирова Л. Ю., Ульянова Е. П., Комова Е. А. и др. Экспрессия P53 и BCL2 при различных подтипах рака молочной железы. Фундаментальные исследования. 2014;(10-1):85–88. EDN: SMJMCL
8. Тимофеева С. В., Шамова Т. В., Ситковская А. О. 3D-биопринтинг микроокружения опухоли: последние достижения. Журнал общей биологии. 2021;82(5):389–400. <https://doi.org/10.31857/S0044459621050067>, EDN: GMEORZ
9. Jubelin C, Muñoz-García J, Griscorn L, Cochonneau D, Ollivier E, Heymann MF, et al. Three-dimensional *in vitro* culture models in oncology research. Cell Biosci. 2022 Sep 11;12(1):155. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00887-3>
10. Zhuang P, Chiang YH, Fernanda MS, He M. Using Spheroids as Building Blocks Towards 3D Bioprinting of Tumor Microenvironment. Int J Bioprint. 2021;7(4):444. <https://doi.org/10.18063/ijb.v7i4.444>
11. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. Science. 1977 Jul 29;197(4302):461–463. <https://doi.org/10.1126/science.560061>

12. Филиппова С. Ю., Ситковская А. О., Бондаренко Е. С., Новикова И. А., Харагезов Д. А., Позднякова В. В. и др. Опыт применения инкапсуляции в альгинат для исследования влияния EGF и FGF2 на пролиферацию клеток колоректального рака в условиях пониженной адгезии *in vitro*. Цитология. 2021;63(2):184–192. <https://doi.org/10.31857/S0041377121020024>, EDN: QMRKCI
13. Johnson PA, Menegatti S, Chambers AC, Alibhai D, Collard TJ, Williams AC, et al. A rapid high throughput bioprinted colorectal cancer spheroid platform for in vitro drug- and radiation-response. *Biofabrication*. 2022 Nov 2;15(1). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac999f>
14. Филиппова С. Ю., Ситковская А. О., Тимофеева С. В., Чембарова Т. В., Межевова И. В., Гненная Н. В. и др. Опыт получения многокомпонентной трёхмерной клеточной модели опухолевого роста для молекулярно-генетических исследований рака молочной железы. Научное электронное периодическое издание ЮФУ «Живые и биокосные системы». 2022;(42). <https://doi.org/10.18522/2308-9709-2022-42-9>, EDN: WMULYR
15. Aggarwal V, Miranda O, Johnston PA, Sant S. Three dimensional engineered models to study hypoxia biology in breast cancer. *Cancer Lett*. 2020 Oct 10;490:124–142. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.030>
16. Hompland T, Fjeldbo CS, Lyng H. Tumor Hypoxia as a Barrier in Cancer Therapy: Why Levels Matter. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 28;13(3):499. <https://doi.org/10.3390/cancers13030499>

Информация об авторах:

Филиппова Светлана Юрьевна – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>, SPIN: 9586-2785, AuthorID: 791081, ResearcherID: AAN-4408-2020, Scopus Author ID: 57189618843

Чембарова Татьяна Владимировна ✉ – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4555-8556>, SPIN: 5426-1873, AuthorID: 1051985, ResearcherID: AAR-3198-2021, Scopus Author ID: 57221303597

Тимофеева Софья Владимировна – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5945-5961>, SPIN: 5362-1915, AuthorID: 1064599, ResearcherID: AAN-4834-2020, Scopus Author ID: 57243356500

Межевова Ирина Валентиновна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>, SPIN: 3367-1741, AuthorID: 1011695, ResearcherID: AAI-1860-2019, Scopus Author ID: 57296602900

Гненная Надежда Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3691-3317>, SPIN: 9244-2318, AuthorID: 900758, ResearcherID: V-5582-2018, Scopus Author ID: 57214806863

Новикова Инна Арнольдовна – кандидат медицинских наук, заместитель генерального директора по науке, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>, SPIN: 4810-2424, AuthorID: 726229, ResearcherID: E-7710-2018, Scopus Author ID: 57202252773

Лаптева Татьяна Олеговна – заведующая патологоанатомическим отделением, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6544-6113>, SPIN: 2771-3213, AuthorID: 849370

Участие авторов:

Филиппова С. Ю. – научное руководство, концепция исследования, развитие методологии;

Чембарова Т. В. – доработка текста;

Тимофеева С. В. – статистическая обработка результатов;

Межевова И. В. – проведение экспериментов;

Гненная Н. В. – проведение экспериментов;

Новикова И. А. – научное руководство;

Лаптева Т. О. – гистологические исследования.

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.